

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

На правах рукописи

ТУРУБАНОВА ВИКТОРИЯ ДМИТРИЕВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ИММУННОГО ОТВЕТА
ПРИ ФОТОЗАВИСИМОЙ ИММУНОГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ**

1.5.5 – физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:

доктор биологических наук

Мария Валерьевна Ведунова;

доктор медицинских наук, профессор

Крысько Дмитрий Вадимович

Нижний Новгород - 2021 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
1. Обзор литературы	14
1.1. Особенности инвазивных опухолей как мишеней в терапии рака	14
1.2. Иммуногенная клеточная гибель опухолевых клеток	17
1.3. Различные пути запрограммированной клеточной гибели опухолевых клеток	21
1.4. Молекулярные детерминанты иммуногенной клеточной смерти	24
1.5. Механизм активации адаптивного противоопухолевого иммунного ответа	26
1.6. Фотодинамическая терапия онкологических заболеваний	28
1.7. Фотодинамическая терапия как индуктор иммуногенной клеточной смерти	32
1.8. Перспективы <i>in vivo</i> вакцинации мышей фотоиндуцированными клетками	35
2.1. Объект исследования	37
2.2. Материалы исследования	37
2.3. Методы	39
2.3.1. Культивирование опухолевых линий	39
2.3.2. Индукция клеточной смерти	40
2.3.3. Оценка цитотоксичности фотосенсибилизаторов МТТ-тестом	41
2.3.4. Анализ процента гибели популяций опухолевых клеток после индукции клеточной смерти	41
2.3.5. Оценка скорости поступления фотосенсибилизаторов в опухолевые клетки	42
2.3.6. Анализ субклеточной локализации фотосенсибилизаторов	43

2.3.7. Анализ цитотоксичности фотосенсибилизаторов	44
2.3.8. Определение типа клеточной смерти при фотодинамическом воздействии методом ингибиторного анализа	44
2.3.9. Анализ высвобождения HMGB1 умирающими клетками	45
2.3.10. Количественный анализ АТФ во внеклеточной среде после индукции клеточной смерти	46
2.3.11. Анализ экспонирования кальретикулина на поверхности фотодинамически индуцированных клеток	46
2.3.12. Изоляция и культивирование дендритных клеток	47
2.3.13. Анализ фагоцитирующей активности дендритных клеток	47
2.3.14. Определение фенотипического статуса дендритных клеток после сокультивирования с фотоиндуцированными опухолевыми клетками	48
2.3.15. Исследование продукции IL-6 при сокультивировании антиген-презентирующих клеток с фотоиндуцированными опухолевыми клетками	49
2.3.16. Анализ иммуногенности ФДТ <i>in vivo</i>	50
2.3.17. Подготовка вакцины на основе дендритных клеток <i>in vitro</i>	51
2.3.18. Анализ иммуногенных свойств дендритноклеточной вакцины на модели глиомы головного мозга мыши <i>in vivo</i>	52
2.3.19. Магнитно-резонансная томография	53
2.3.20. Статистический анализ	53
3. Результаты и их обсуждение	55
1. Анализ скорости накопления фотосенсибилизаторов в опухолевых клетках	55
2. Оценка локализации фотосенсибилизаторов в компартментах клетки	60
3. Индукция клеточной смерти	66
4. Цитофлуориметрическая оценка процента клеточной гибели фотоиндуцированных клеток	68
5. Ингибиторный анализ для определения типа клеточной гибели при ФДТ	69
6. Анализ высвобождения HMGB1 умирающими клетками	73

7. Количественный анализ АТФ во внеклеточной среде после индукции клеточной смерти	76
8. Анализ экспонирования кальретикулина на поверхности фотодинамически индуцированных клеток	78
9. Анализ фагоцитарной активности дендритных клеток	84
10. Определение активационного статуса дендритных клеток	88
11. Анализ высвобождаемого IL-6 активированными антигенпрезентирующими клетками	97
12. Моделирование профилактической противоопухолевой вакцинации <i>in vivo</i>	99
13. Визуализация опухолевого очага магнитно-резонансной томографией	102
14. Моделирование превентивной вакцинации от глиом умирающими фотоиндуцированными клетками	104
15. Моделирование профилактической противоопухолевой вакцинации дендритноклеточной вакциной <i>in vivo</i>	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
ВЫВОДЫ	119
Список сокращений	120

Введение

Несмотря на достижения современной медицины во всем мире наблюдается неуклонный рост онкологических заболеваний. К 2025 году прогнозируется увеличение заболеваемости на 20,3 миллиона случаев в год (International Agency for Research on Cancer GLOBOCAN). В подавляющем большинстве случаев злокачественная опухоль возникает из небольшого числа мутировавших клеток. При этом известно множество мутаций, которые ассоциированы с развитием этой патологии, но до сих пор нет надежных методов диагностики и профилактики онкологических заболеваний. Существующие стратегии лечения опухолей не оказывают должного терапевтического эффекта и не способны предотвратить появление рецидивов. Онкотрансформированные клетки имеют много возможностей «ускользания» от иммунного надзора и долгое время могут оставаться в организме незамеченными.

Развитие новых способов терапии сосредоточено на вовлечении иммунитета в борьбу со злокачественными образованиями. В число подходов иммунотерапии входит индукция иммуногенной клеточной гибели (Immunogenic cell death, ICD). Концепция заключается в том, что после цитотоксического воздействия онкотрансформированные клетки погибают, высвобождая в межклеточное пространство иммуностимулирующие молекулы, ассоциированные с повреждением DAMPs (damage-associated molecular patterns). Эти молекулы играют ключевую роль в созревании антигенпрезентирующих клеток и активации Т-клеточного ответа на специфический опухолевый антиген. Таким образом комбинируется цитотоксическое действие, оказываемое на раковые клетки и опосредованный иммунный ответ самого организма (Galluzzi et al., 2020). Иммуногенная клеточная смерть — это общий термин, который включает несколько регулируемых форм клеточной гибели, таких как апоптоз (Casares et al., 2005; Galluzzi et al., 2020), некроптоз (Aaes et al., 2016; Aaes et al., 2020) и ферроптоз (Efimova et al., 2020).

Иммуногенный апоптоз представляет собой недавно описанную форму апоптоза, вызванную определенным набором химиотерапевтических препаратов или физическими терапевтическими методами, такими как ионизирующее облучение и фотодинамическая терапия (Nowak et al., 2003; Casares et al., 2005). По сравнению с «классическим» апоптозом, иммуногенный апоптоз характеризуется способностью стимулировать иммунную систему хозяина и усиливать иммунологические ответы на такие протоколы иммунотерапии, как противораковые вакцины на основе дендритных клеток (Zappasodi et al., 2010). Фактически, раковые клетки, подвергающиеся *in vitro* индуцированной химиопрепаратом ICD способны опосредовать «эффект противораковой вакцины» после подкожной имплантации иммунокомпетентным мышам (Obeid et al., 2007). Более того, было показано, что дендритные клетки играют центральную роль в распознавании апоптотических клеток и в инициации иммунного ответа из-за различных стимулов, связанных с гибелью клеток (Obeid et al., 2007). Одной из основных характеристик иммуногенных поврежденных / умирающих клеток является воздействие на плазматическую мембрану или секрецию внутриклеточных молекул, обычно скрытых в живых клетках, которые приобретают иммуностимулирующие свойства (Krysko et al., 2013; Galluzzi et al., 2017).

Одним из методов, вызывающих иммуногенную клеточную смерть в раковых клетках, является фотодинамическая терапия (ФДТ). Этот метод предполагает введение фотосенсибилизирующего агента в клетки с последующей фотоактивацией светом определенной длины волны, что приводит к запуску свободнорадикальных процессов и образованию синглетного кислорода, который оказывает цитотоксический эффект (Liu et al., 2004; Garg et al. 2012a; Gomes-da-Silva et al., 2018, Alzeibak et al., 2020). Наряду с химиотерапией, фотодинамическое воздействие способно активировать регулируемые формы клеточной гибели, образовывать локальное воспаление и стимулировать специфический противоопухолевый иммунный ответ (Garg et al., 2010; Li et al., 2019).

В настоящее время известно только несколько фотосенсибилизаторов, вызывающих иммуногенную клеточную смерть в опухолевых клетках, а именно гиперичин (Adkins et al., 2015), 5-ALA (Garg et al., 2010), ацетат бенгальской розы (Panzarini et al., 2014), гликоконъюгированный хлорин, фоскан и другие (Korbelik, 2011; Dudek et al. 2013 (1), Mitra et al., 2011). Известно, что фотоагенты различной химической природы активируют разные биохимические каскады в опухолевых клетках, чем обуславливается тип клеточной смерти (Boyle and Dolphyn, 1996; Uzdensky et al., 2001; Gomes-da-Silva et al., 2018; Jiang et al., 2019). Критическим в процессе фотоповреждения является локализация фотоагента в органеллах клетки, так как синглетный кислород может повреждать только структуры, находящиеся в непосредственной близости от молекул фотосенсибилизатора (Moan and Berg, 1991; Узденский, 2010). Запускаемые молекулярные каскады ведут к активации программ регулируемой клеточной гибели, которые могут быть ингибированы специфическими блокаторами (Aaes et al., 2020, Efimova et al., 2020).

Фотодинамическая терапия обладает низкой токсичностью для нормальных тканей, отсутствием механизмов резистентности, возможностью комбинации с другими методами лечения, удобством применения. Запуск механизма иммуногенной клеточной смерти при помощи фотодинамического воздействия способствует стимуляции противоопухолевого иммунитета, что является основным преимуществом по сравнению с традиционными методами лечения онкологических заболеваний, которые являются иммунологически не активными или даже иммунодепрессивными. Поэтому важно проводить изучение свойств фотосенсибилизаторов и оценку их иммуногенного вклада в гибель раковых клеток.

В представленной работе исследовались клинически-одобренные препараты для фотодинамической терапии Фотосенс (ГНЦ «НИОПИК», Россия) и Фотодитазин («Вета-гранд», Россия), которые используются в терапии мезотелиомы, раке пищевода, злокачественного плеврита, раке простаты, женских половых органов, нейроонкологий и других (Qualls and Thompson, 2001; Романко и

др., 2004; Пак и др., 2013; Лукьянец, 2013; Сарибекян и Пак, 2013; Филоненко, 2014; Филоненко и др. 2015; Рахимжанова и др, 2019). В совокупности с химиотерапией и лазерной гипертермией препараты применяются в лечении рака кожи и слизистых, а также при метастазах рака молочной железы. Также в работе были исследованы иммуногенные свойства новых фотодинамических агентов собственной разработки ИМХ РАН из группы тетра(арил)тетрацианопорфиразинов с различными арильными группами в качестве боковых заместителей.

Цель и основные задачи исследования

Целью настоящего исследования стало изучение особенностей противоопухолевого иммунного ответа при индукции фотозависимой иммуногенной клеточной смерти.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Определить локализацию фотосенсибилизаторов и тип клеточной смерти вследствие фотодинамического воздействия для клеток глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205;
2. Выявить особенности высвобождения молекулярных паттернов ассоциированных с повреждением при фотоиндуцированной клеточной гибели для разных типов опухолевых клеток;
3. Оценить фенотипический статус дендритных клеток и интенсивность высвобождения цитокинов при совместном культивировании с фотоиндуцированными клетками;
4. Проанализировать иммуногенный потенциал фотоиндуцированных опухолевых клеток на моделях профилактической противоопухолевой вакцинации *in vivo*.

Научная новизна

Впервые для клеток глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205 определена локализация фотосенсибилизаторов в компартментах клетки и тип клеточной смерти вследствие фотодинамического воздействия. Показано, что накопление фотоагентов различной химической природы в аппарате Гольджи приводило к апоптотической гибели опухолевых клеток, тогда как локализация в лизосомах ассоциирована с гибелью по пути ферроптоза и некроптоза. Таким образом, накопление в ЭПР, аппарате Гольджи и лизосомах вызывало регулируемые формы клеточной смерти при фотодинамическом воздействии.

Впервые проанализированы уровни высвобождения опухолевыми клетками ключевых DAMPs вследствие индукции фотоагентами фотосенс и фотодитазин, порфиразин I и III.

Показана активация компонентов иммунной системы в ответ на взаимодействие с опухолевыми клетками после ФДТ *in vitro*. Фотоиндуцированные клетки опухолевых линий вызывают фенотипическое созревание дендритных клеток. Препараты фотосенс и фотодитазин в модели активации антигенпрезентирующих клеток *in vitro* активируют поверхностную экспрессию ко-стимулирующей молекулы CD86, способствующей дифференцировке Т-лимфоцитов. В группе применения фотосенсибилизаторов порфиразин I и порфиразин III на поверхности дендритных клеток зарегистрирована экспрессия маркера дифференцировки CD80, который также является активатором специфического иммунного ответа. В отдельных группах дендритных клеток, сокультивированных с умирающими клетками фибросаркомы, установлена повышенная экспрессия главного комплекса гистосовместимости 2 класса (МНС II) и ко-стимулирующей молекулы CD40.

Охарактеризован уровень провоспалительного цитокина IL-6 в супернатантах дендритных клеток после взаимодействия с фотоиндуцированными клетками. Установлены высокие уровни интерлейкина-6 в группах с

использованием фотосенса и фотодитазина, что говорит о иммуногенности умирающих опухолевых клеток.

На модели профилактической противоопухолевой вакцинации *in vivo* самок иммунокомпетентной линии мышей показаны ярко выраженные признаки активации адаптивной иммунной системы с применением всех изучаемых фотосенсибилизаторов. При иммунизации клетками, обработанных фотосенсом, фотодитазином, порфиразинами I и III, установлено значимое снижение интенсивности развития опухолевых процессов.

Впервые при использовании новых тетра(арил)тетрацианопорфиразинов доказана роль адаптивного иммунитета в противоопухолевом ответе организма на модели иммунодефицитных животных.

При иммунизации мышей показано, что фотосенс-индуцированные клетки глиомы линии GL261 эффективно защищают от развития опухолевого очага, а дендритноклеточная вакцина на основе фотоактивированных клеток значительно увеличивает выживаемость животных. Это свидетельствует о иммуногенности гибели опухолевых клеток после фотодинамического воздействия и является основой терапевтического протокола применения вакцины на основе дендритных клеток.

Научно-практическое значение

Исследования способности различных цитотоксических агентов запускать иммуногенную клеточную смерть имеют большое значение для развития подходов к лечению злокачественных образований. Вектор развития противоопухолевой терапии направлен на достижение долгосрочного терапевтического эффекта. Анализ иммуногенных свойств коммерческих фотосенсибилизаторов, которые широко применяются в клинической практике, в перспективе позволит скорректировать тактику лечения и повысить эффективность противоопухолевой терапии.

Изучение новых тетраалилтетрацианопорфиразинов, сочетающих в себе свойства фотоагентов со свойствами флуоресцирующих молекулярных роторов, представляет собой интерес, поскольку фотоактивируемая гибель клетки сопровождается изменением ее вязкостных свойств. При использовании данных фотосенсибилизаторов становится возможным мониторинг функционального состояния клеток облучаемой ткани непосредственно в ходе процедуры.

Новые подходы и возможности использования фотодинамической терапии позволят расширить их применение и разработать индивидуальные опухолеспецифичные стратегии лечения онкологических заболеваний на основе запуска программ иммуногенной клеточной смерти. Активация иммунного ответа, специфичного для раковых клеток, генерирует сильный и длительный противораковый иммунитет (Casares et al., 2005, Galluzzi et al., 2017).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Накопление исследуемых фотосенсибилизаторов в ЭПР, аппарате Гольджи и лизосомах вызывает регулируемые формы клеточной смерти.
2. Различные по химическому строению и клеточной локализации фотоагенты способны активировать компоненты иммунной системы *in vitro*.
3. При иммунизации мышей разными типами вакцин (умирающими опухолевыми клетками и дендритноклеточной вакциной) на основе фотоиндуцированных опухолевых клеток, активируются адаптивные иммунные реакции, подавляющие опухолевый рост.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также совместно с соавторами участвовал в написании

научных статей и апробации результатов исследования на семинарах, конференциях и симпозиумах.

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и обусловлена широкой апробацией и надёжностью использования экспериментальных методов исследования, а также качественной и количественной согласованностью с результатами независимых исследований других авторов.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на 18 международных и российских мероприятиях, в том числе: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (8 - 12 апреля 2019, Москва), 23-я Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (15 - 19 апреля 2019, Пушино), «7th OncoPoint Symposium» (20 марта 2019, Гент, Бельгия), XV Международный междисциплинарный Конгресс "Нейронаука для медицины и психологии" и научная Школа "Достижения междисциплинарной нейронауки в XXI веке" (30 мая – 10 июня 2019, Судак, Крым), 72-я всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (23 - 26 апреля 2019, Нижний Новгород), XXI Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (24 - 29 февраля 2020, Курчатовский институт, Санкт-Петербург), Международная конференция «14th digital World Immune Regulation Meeting» (WIRM, 2020), 73-я всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (28 - 30 октября 2020, Нижний Новгород), 25

Нижегородская сессия молодых ученых (10 - 13 ноября 2020, Нижний Новгород) и др.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 23 работы, из них 5 статей в реферируемых журналах, входящих в перечень ВАК, 18 тезисов в сборниках всероссийских и международных конференций

Структура и объем диссертации

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы. Работа изложена на 139 страницах, содержит 52 рисунка и 2 таблицы. Список литературы содержит 151 источник.

1. Обзор литературы

1.1. Особенности инвазивных опухолей как мишеней в терапии рака

Онкогенез представляет собой многоэтапный процесс, приводящий к прогрессивному превращению нормальных клеток в высоко злокачественные производные (Hanahan and Weinberg, 2011). Трансформация происходит в результате генетических изменений, вследствие чего геномы опухолевых клеток накапливают хромосомные мутаций (Kinzler, 1997; Lemmon and Schlessinger, 2010; Witsch et al., 2010). Предполагается, что обширное разнообразие генотипов опухолевых клеток проявляется в шести существенных изменениях в физиологии, которые в совокупности определяют злокачественный рост: самодостаточность сигналов роста, нечувствительность к ингибиторам роста, уклонение от запрограммированной клеточной смерти, неограниченный репликативный потенциал, устойчивый ангиогенез в микроокружении, высокая степень инвазивности и метастазирования. Каждое из этих физиологических явлений – нарушение механизма противораковой защиты организма (Hanahan and Weinberg, 2011).

В нормальном физиологическом состоянии иммунитет способен противостоять развитию малигнизированных клеток, включая популяции макрофагов и Т-лимфоцитов в противоопухолевую борьбу (Toscano et al., 2007). Но трансформированные клетки находят возможности избегать распознавания. Иммунное уклонение от рака включает сдвиг иммунных ответов от CD4⁺Т-хелперов первого типа (Th1), способствующих развитию клеточного иммунного ответа, на Т-клетки, участвующие в гуморальном ответе (Th2). Помимо этого, толерантность организма к трансформированным клеткам определяет привлечение дефектных антигенпрезентирующих клеток, нарушение цитотоксической активности CD8⁺Т-клеток и естественных киллеров (natural killer, NK), и усиление активности иммуноподавляющих клеток, таких как клетки-супрессоры миелоидного происхождения (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) и регуляторные Т-клетки (Treg) (Toscano et al., 2007). Также микроокружение

опухоли (tumor microenvironment, TME), состоящее из нормальных фибробластов и эндотелиальных клеток, защищает новообразование от иммунного надзора. Опухолевые клетки испускают растворимые иммуносупрессивные факторы, например простагландины. Под действием простагландина E в лимфоцитах повышается уровень циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), в результате чего блокируется стимулируемая опухолевыми антигенами пролиферация Т-лимфоцитов (Wang, DuBois, 2016). NK-клетки участвуют в иммунных ответах на опухоли, убивая клетки-мишени и продуцируя цитокины. Однако в иммунодепрессивном микроокружении опухоли NK-клетки становятся дисфункциональными из-за воздействия ингибирующих молекул, продуцируемых раковыми клетками, что приводит к прогрессированию опухолевого очага (Cozar et al., 2020).

Еще одна стратегия заключается в подавлении созревания нормальных дендритных клеток (ДК) при одновременном стимулировании толерогенного фенотипа ДК. Опухоли секретируют ряд факторов с таким действием, главным из которых является VEGF-A (Vascular endothelial growth factor A) (Melero et al., 2014). Растущее количество данных также указывает на участие ряда дополнительных факторов опухолевого происхождения, которые могут нарушать нормальные функции дендритных клеток, включая TGF- β и интерлейкин 10, а также физиологические стимулы, такие как гипоксия (Tormoen et al., 2018). Миграция толерогенных дендритных клеток в лимфатические узлы приведет к появлению толерантных Т-клеток. А ДК, высвобождающие IL-10, вызывают дифференцировку Treg клеток из наивных CD4⁺Т-клеток.

Дополнительным механизмом, ограничивающим противоопухолевый иммунный ответ, является наличие в опухолевом очаге подавляющих иммунный ответ клеточных популяций. В частности, привлечение миелоидных клеток, таких как супрессорные клетки миелоидного происхождения и опухолевые макрофаги (Tumor-associated macrophages, TAM), незрелые дендритные клетки и иммунодепрессивные нейтрофилы (Gabrilovich et al., 2012). Высвобождаемый

опухолью фактор TNF- α вызывает секрецию макрофагами хемокина CCL8, что влияет на способность малигнизированных клеток проникать в соседние ткани.

Рекрутирование регуляторных Т-клеток (Treg) является еще одним эффективным механизмом подавления иммунитета. При этом, при гипоксическом стрессе опухоли секретируют хемокин CCL28, который избирательно привлекает Т-регуляторные популяции и способствует ангиогенезу опухоли (Azam et al., 2010; Facciabene et al., 2011). Опухолевые макрофаги имеют на поверхности хемокиновый лиганд 22 (CCL22), который также привлекает Treg клетки (Curiel et al., 2004).

Попадая в опухолевый очаг, противоопухолевые Т-клетки сталкиваются с важной задачей преодоления действия иммуносупрессивного окружения. На уничтожение Т-клеток, выработку цитокинов и выживаемость отрицательно влияет рецептор запрограммированной смерти-1 (PD-1) и его лиганды, PD-L1 (B7-H1) и PD-L2 (B7-DC), которые являются активаторами подавления Т-клеток (Melero et al., 2014).

Раковые клетки экспрессируют антигены, но иммунитет не в состоянии отличить их от толеризованных аутоантигенов. Часто виды рака, обладающие этой способностью, имеют низкую частоту мутаций и продуцируют мало антигенов *de novo* (Schumacher et al., 2015). Примерами являются глиобластома (Razavi et al., 2016), рак яичников (Preston et al., 2011) и другие виды рака, в которых отсутствуют стимулирующие неоантигены рака и которые способствуют подавлению иммунитета в микроокружении опухоли за счет продукции противовоспалительных цитокинов (Green et al., 2009). Эта проблема усугубляется тем фактом, что некоторые методы лечения рака вызывают апоптотическую гибель клеток, которая не индуцирует иммунный ответ и даже может ослаблять иммунную систему, вызывая рецидивы (Green et al., 2009). Однако недавно появилась группа химиотерапевтических средств, которые вызывают форму апоптоза, известную как иммуногенная клеточная смерть (ICD), предупреждая иммунную систему о присутствии умирающих раковых клеток (Casares et al., 2005). Индукция

иммуногенной гибели опухолевых клеток может потенциально превратить эти умирающие раковые клетки в «вакцины» для стимуляции противоракового иммунитета за счет созревания дендритных клеток и активации цитотоксических Т-лимфоцитов (Showalter et al., 2017), а также повышения цитотоксической активности NK-клеток.

1.2. Иммуногенная клеточная гибель опухолевых клеток

Лечение опухолей в настоящий момент сводится к удалению опухолевого очага хирургическим путем, химиотерапии или другим методам, которые способствуют гибели раковых клеток в организме. Традиционные способы терапии онкологических заболеваний не гарантируют защиты от рецидива и метастазирования, часто нанося ущерб здоровым тканям в период лечения (Casares et al., 2005; Wang et al., 2018).

В рамках своего нормального функционирования иммунная система обнаруживает и уничтожает аномальные клетки и предотвращает или сдерживает рост опухолевых клеток. Успешный противоопухолевый иммунитет требует нацеливания Т-лимфоцитов против опухолевых антигенов, доставки этих противоопухолевых Т-клеток в опухолевую ткань, инфильтрации опухоли Т-клетками и локальной активации для уничтожения опухолевых клеток. Также важным этапом является очищение организма от лизированных опухолевых клеток и восстановления нормальной тканевой архитектуры и гомеостаза. Эти шаги требуют скоординированной активности врожденных и адаптивных иммунных клеток и зависят от большого количества целевых опухолевых антигенов (Egen et al., 2020). Но несмотря на то, что иммунная система может остановить развитие онкологического заболевания, у раковых клеток есть способы избежать разрушения иммунной системой (Schreiber et al., 2011; Kepp et al., 2014; Galluzzi et al., 2018; Bugter et al., 2021).

Восстановление иммунного контроля над ростом опухоли путем стимулирования адаптивных иммунных ответов может привести к регрессии опухоли и является основной целью иммунотерапии. Иммунотерапия рака - это вид лечения опухолевых заболеваний, который помогает иммунной системе сосредоточиться на уничтожении раковых клеток (Showalter et al., 2017). Иммунный ответ включает как специфические, так и неспецифические компоненты. Неспецифические компоненты действуют как барьеры для широкого спектра патогенов, независимо от их антигенного состава. Специфические компоненты иммунной системы приспособляются к каждому новому антигену и могут генерировать специфичный для патогена иммунитет.

Для лечения онкологических заболеваний используют несколько типов иммунотерапии. Новаторскими были исследования Джеймса Эллисона и Тасуку Хёндзё в области терапии ингибированием контрольных точек. Этот подход основан на блокировании CTLA-4 и PD-1 на мембране Т-клеток, которые препятствуют образованию клонов CD8⁺Т-киллеров и уничтожению опухолевых клеток (Wei et al., 2017; Chamoto et al., 2017).

Недавние исследования также были сосредоточены на увеличении проникновения и дифференцировки иммунных клеток в место опухоли за счет выработки антител против растворимых факторов, секретируемых опухолью, таких как TGFβ. Этот фактор играет важную роль в привлечении нормальных фибробластов в микроокружение, которые становятся основой для развития опухолевого очага (Labani-Motlagh et al., 2020). Антитела против TGFβ уже прошли клинические испытания для различных солидных форм рака, где они тестируются отдельно и в комбинации с агентами против PD-1 (Dodagatta-Marri et al., 2019).

В 2005 году была описана форма иммуногенного апоптоза раковых клеток, которая вызывала активацию дендритных клеток. Экспериментальные модели *in vivo* подтвердили регресс сформировавшихся опухолей у мышей после воздействия доксирубина (Casares et al., 2005). Эта работа дала начало широкому

обсуждению концепции иммуногенной смерти опухолевых клеток (immunogenic cell death, ICD) (рис. 1).

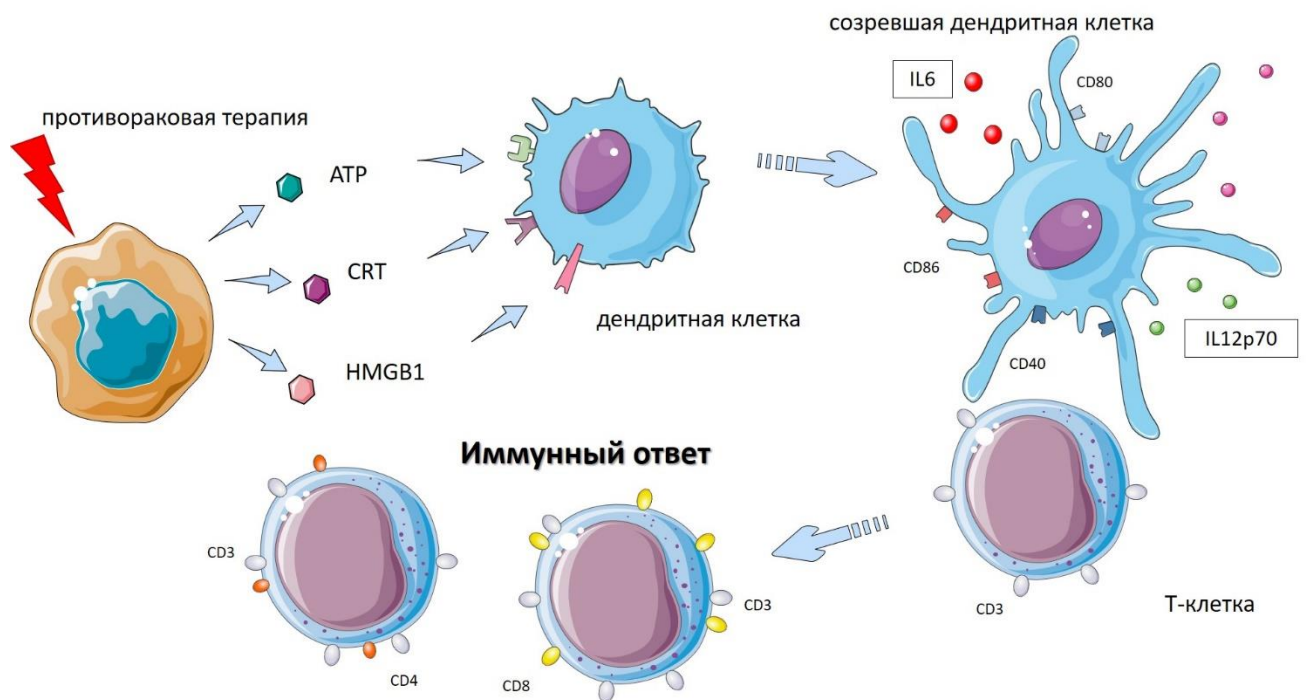


Рисунок 1. Механизм активации иммунного ответа вследствие активации иммуногенной формы клеточной смерти (по Krysko et al., 2012)

Многие химиотерапевтические агенты проявляют свои цитотоксические эффекты путем запуска апоптоза опухолевых клеток, который ранее считался невоспалительным, иммунологически молчащим или толерогенным способом клеточной гибели (Savill and Fadok, 2000). Это было оспорено серией наблюдений, сделанных более двадцати лет назад, которые показали, что дендритные клетки иммунной системы могут поглощать апоптотические опухолевые клетки и перекрестно представлять интернализированные антигены на молекулах МНС I класса CD8⁺Т-клеткам (Albert et al., 1998). Этот же эффект был показан в экспериментах *in vivo* (Nowak et al., 2003). После этого были описаны две морфологически эквивалентные, но иммунологически различные подкатегории апоптоза, то есть иммуногенный и неиммуногенный апоптоз (Casares et al., 2005; Obeid et al., 2007a).

В микроокружении опухоли иммуногенная клеточная смерть (ICD) играет важную роль в стимуляции дисфункциональной противоопухолевой иммунной системы (Zhou et al., 2019).

Необходимо выполнить несколько условий, чтобы определить гибель опухолевых клеток как иммуногенную. Было установлено, что ICD зависит от сопутствующей генерации активных форм кислорода (АФК) и активации стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) (в том числе стресс ЭПР вследствие генерации АФК) (Kepp et al., 2013; Garg et al., 2012b; Kepp et al., 2014). В ходе гибели раковых клеток происходит испускание молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMPs), которые играют роль сигналов «съешь меня» для фагоцитирующих компонентов иммунной системы. DAMPs играют решающую роль для гибели по иммуногенному пути. К ключевым DAMPs относят (1) поверхностное экспонирование кальретикулина (CRT) (Panaretakis et al., 2008; Kepp et al., 2010), (2) преапоптотическую (блеббинговую) стадию секреции аденозинтрифосфата (АТФ) (Garg et al., 2011), (3) высвобождение белков HMGB1 и других агонистов Toll-подобного рецептора (TLR), таких как HSP70 (Tesniere et al., 2008; Garg et al., 2012a).

Во время гибели клетки по иммуногенному пути, АТФ высвобождается зависимым от аутофагии путем посредством активного экзоцитоза АТФ-содержащих пузырьков через каналы паннексина (Fucikova et al., 2020). АТФ действует как хемоаттрактант для незрелых дендритных клеток и активирует пуринергические рецепторы P2X7 на ДК. Также внеклеточный АТФ опосредует провоспалительные эффекты при активации CASP1-зависимой инфламмасомы NLRP3 и последующей секреции функционального интерлейкина 1 бета (IL-1 β) (Ghiringhelli et al., 2009; Kepp et al 2014).

Связывание HMGB1 (высвобождаемого из иммуногенных умирающих клеток) с Toll-подобным рецептором 4 (TLR4, в основном экспрессируемым на ДК) жизненно важно для активации дендритных клеток и облегчения презентации антигена дендритными клетками Т-клеткам. Более того, распознавание HMGB1

рецептором TLR4 запускает внутриклеточную передачу сигнала, зависящую от MyD88 (ген ответа первичной миелоидной дифференцировки), специфичного для TLR4. Путь TLR4 / MyD88 усиливает процессинг опухолевого антигена путем ингибирования слияния фагосом и лизосом, что способствует процессингу фагоцитированного материала опухолевых клеток в ДК и ускоряет поглощение опухолевых клеток антигенпрезентирующими клетками (Apetoh et al., 2007; Lamberti et al., 2020).

Кульретикулин попадает на поверхность клетки на ранней стадии иммуногенной смерти, то есть до связанного с апоптозом перемещения фосфатидилсерина между внутренним и внешним листком плазматической мембраны (Obeid et al., 2007). После связывания с белком, связанным с рецептором липопротеинов низкой плотности (LRP1, также известным как CD91), экспонированный через мембрану кальретикулин доставляет основной фагоцитарный сигнал профессиональным антигенпрезентирующим клеткам (APC), улучшая их способность поглощать мертвые клетки (Kepp et al., 2014).

1.3. Различные пути запрограммированной клеточной гибели опухолевых клеток

Иммуногенная гибель клеток – это общий термин, охватывающий несколько способов гибели, таких как апоптоз, некроптоз, ферроптоз, каспазо-зависимую гибель клеток и другие. Всего выделяют около 12 типов регулируемой клеточной смерти (Krysko et al., 2012; Kepp et al., 2014). Хотя эти способы отличаются друг от друга морфологически и биохимически, все они характеризуются испусканием иммуностимулирующих молекул.

Апоптоз является неоднородным по отношению к запрограммированным событиям передачи сигналов, ответственным за гибель клеток (Ferri and Kroemer, 2001). Морфологически апоптоз сопровождается конденсацией хроматина (пикноз) и ядерной фрагментацией (кариорексис), происходящей в пределах

целостной плазматической мембраны. Некроз отличается пермеабиллизацией плазмалеммы на ранних стадиях процесса смерти. В биохимическом плане апоптоз часто сопровождается активацией специфической группы цистеинкиназ - каспаз (Igney and Krammer, 2002). Поскольку апоптоз является физиологическим процессом, который охватывает нескольких миллионов клеток в секунду в организме человека, предполагается, что этот тип гибели клеток происходит без испускания «сигналов опасности», которые вызвали бы активный иммунный ответ (Matzinger, 2002). Это важно, так как сохранение гомеостаза всего тела включает в себя непрерывную смену множества клеточных популяций, а активация иммунного ответа против антигенов, связанных с мертвыми клетками, имела бы катастрофические последствия. Таким образом умирающие от апоптоза клетки избегают иммунного распознавания, при этом эффективно фагоцитируются. Дефекты фагоцитоза или иммунного распознавания умирающих клеток запускают аутоиммунные реакции, таким образом нарушая аутоотолерантность (Hanayama et al, 2004).

Однако, в 2003 году экспериментально было доказано, что индуцированный гемцитабином апоптоз клеток мезотелиомы AВ1, может активировать CD8⁺T-клетки *in vivo*, вызывая тем самым эффективный противоопухолевый иммунный ответ (Nowak, 2003). Более поздние данные показали, что некоторые, но не все схемы апоптоза, вызванного химиотерапией, могут вызывать эффективный противоопухолевый иммунный ответ (Casares et al., 2005; Schreiber et al., 2011).

Некроз – это нерегулируемый способ гибели клеток, который может быть вызван экстремальным физико-химическим стрессом (например, тепловым шоком и оттаиванием) (Gamrekelashvili et al., 2012; Aaes et al., 2016, Efimova et al., 2020). Некроптоз является формой регулируемой гибели клеток, которая реализуется через взаимодействие с рецептором серинтреонинкиназой 3 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3, RIPK3) катализированным фосфорилированием в виде домена MLKL, что приводит к быстрому образованию олигомеров MLKL, которые необратимо проникают через плазматическую мембрану (Wang et al.,

2014; Dondelinger et al., 2014). Клетки, подвергающиеся некроптозу, запускают как некротические внутриклеточные каскады, например, утечку лактатдегидрогеназы (LDH) через разрыв плазматической мембраны, так и аутофагические события - образование белков, ассоциированных с цитоскелетом (например, LC3) и образование аутофагосом (Degterev et al., 2005; Miki et al., 2015). В настоящее время исследована некроптотическая гибель и показано, что раковые клетки, подвергающиеся некроптозу, могут быть иммуногенными (Aaes et al., 2016). Эта иммуногенность была показана в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, где некроптотические клетки служили мощными иммунизаторами в модели профилактической противоопухолевой вакцинации (Aaes et al., 2016). Эти данные показали, что некроптотические раковые клетки являются мощными индукторами адаптивного иммунного ответа и обеспечивают эффективный противоопухолевый иммунитет (Aaes et al., 2016; Tang et al., 2019).

Ферроптоз характеризуется железо-зависимой продукцией активных форм кислорода (АФК) и перекисным окислением липидов и осуществляется путем оксигенации полиненасыщенных фосфатидилэтаноламинов. Такой тип гибели клеток может быть заблокирован блокаторами перекисного окисления липидов, например ferrostatin-1, витамином E (Bebber et al., 2020). Окисленные фосфатидилэтаноламины имеют решающее значение для осуществления ферроптоза. Ферроптоз может быть вызван блокированием антипортерной системы цистин / глутамат или глутатионпероксидазы 4 (GPX4), что приводит к дефектной окислительно-восстановительной системе (Dixon et al., 2012). Некоторые исследования предполагают, что противоопухолевые агенты оказывают терапевтические эффекты, активируя ферроптоз (Kagan et al., 2017; D'Herde and Krysko, 2017). В качестве таких химиотерапевтических агентов использовались цисплатин (Guo et al., 2018), темозоломид (Sehm et al., 2016), пиперлонгумин (Yamaguchi et al., 2018), RSL-3 (Efimova et al., 2020).

1.4. Молекулярные детерминанты иммуногенной клеточной смерти

Гибель опухолевых клеток должна удовлетворять нескольким критериям, чтобы являться иммуногенной. Во-первых, раковые клетки, поддающиеся ICD *in vitro* в отсутствии какого-либо активатора иммунитета, должны вызывать иммунный ответ, который защищает мышей от последующего заражения живыми опухолевыми клетками того же типа. Во-вторых, гибель клеток, возникающая *in vivo*, должна стимулировать местный иммунный ответ и приводить к ингибированию роста опухоли (Kroemer et al. 2013).

Отличительной чертой иммуногенной клеточной смерти является преапоптотическое появления эктокальретикулина, секреция АТФ во время фазы образования мембранных апоптотических пузырьков и высвобождение негистонового белка HMGB1 (Obeid et al., 2007a; Tesniere et al., 2010; Kepp et al., 2014).

Кальретикулин (CRT) — это растворимый белок в просвете ретикулума, традиционно рассматриваемый как регулятор гомеостаза Ca^{2+} . Он участвует в нескольких функциях внутри и вне ЭПР, таких как регуляция активности шаперонов, сборка молекул главного комплекса гистосовместимости класса I, а также клеточная пролиферация и миграция. Было показано, что определенные противораковые стратегии индуцируют ICD опухолевых клеток, характеризующихся поверхностным воздействием CRT до появления признаков апоптоза (Obeid et al., 2007). Кальретикулин, экспонированный на поверхности, способствует презентации опухолевого антигена и опухолеспецифическим цитотоксическим ответам Т-лимфоцитов.

Описано несколько путей транслокации CRT. Первый описанный путь индуцируется антрациклинами и зависит от PERK-опосредованного эукариотического фактора инициации 2 α - фосфорилирования ($eIF2\ \alpha$ -P), секреторного пути и BAP31-зависимой активации белков BAX или BAK, опосредованной каспазой-8 (Panaretakis et al., 2009). Второй вариант механизма задействует PERK, BAX или BAK для поверхностной транслокации CRT в ответ

на фотодинамическую терапию с использованием гиперическогоина (Garg et al., 2012a). В этом случае PERK управлял трафиком эртокальеретиккулина, а eIF2 α - фосфорилирование и передача сигналов каспазы-8 не влияло на экспонирование. Путь, который используется для транслокации CRT, сильно зависит от стадии апоптоза, во время которой происходит воздействие (Krysko et al., 2012).

Активное высвобождение АТФ индуцированными клетками осуществляется механизмами везикулярного транспорта. Индукция секреции АТФ при стрессе ЭПР зависит от PERK, но не зависит от BAX / BAK путей. Кроме того, процесс секреции АТФ также включает секреторный путь, зависящий от киназы R13. Это также указывает на ЭПР и аппарат Гольджи как на возможные источники секретированного АТФ. Наблюдалось, что после стресса эндоплазматического ретикулума внутриклеточные уровни АТФ повышаются на пре-апоптотической стадии (Garg et al., 2012c).

В настоящее время доказано, что внеклеточный HMGB1 участвует во многих биологических процессах, таких как ангиогенез, миогенез, хемотаксис и регенерация тканей. Для выполнения своих функций внеклеточный HMGB1 связывается с различными рецепторами, включая TLR2, TLR4, TLR9 и рецептор конечных продуктов гликозилирования (RAGE). Первоначально предполагалось, что HMGB1 пассивно высвобождается только из некротических клеток, тогда как апоптотические клетки сохраняют его в ядре (Scaffidi et al., 2002) Однако стало ясно, что большинство противораковых агентов и индукторов апоптоза и ICD могут способствовать высвобождению HMGB1. Было показано, что внеклеточный HMGB1 необходим для иммуногенности ICD в моделировании профилактической вакцинации против опухолей: иммунизация мышей HMGB1 истощает раковые клетки CT26, а инъекция антител против HMGB1 ставит под угрозу способность мышей сопротивляться повторному заражению живыми раковыми клетками CT26 (Apetoh et al., 2007, Tang et al., 2019).

Также важными компонентами иммуногенной гибели являются молекулы, которые необходимы для различных процессов, таких как аутофагия (например, ATG5, ATG7 и BCL2), лизосомный экзоцитоз (например, LAMP1, VAMP1), апоптоз (например, каспазы), образование мембранных везикул (например, ROCK1, миозин II) и проницаемость плазматической мембраны (например, PANX1). Возникновение молекулярного дефекта в любой из этих систем достаточно для отмены поступления АТФ из клеток, подвергшихся воздействию индукторов иммуногенной гибели. Таким образом, изменения в аутофагии, лизосомальной функции, активации каспаз, образовании апоптотических телец и проницаемости плазматической мембраны могут способствовать развитию резистентных к терапии новообразований (Martins et al., 2014).

1.5. Механизм активации адаптивного противоопухолевого иммунного ответа

Активация адаптивного иммунного ответа против эндогенных объектов зависит от передачи сигналов рецепторов распознавания паттернов (Pattern recognition receptors, PRR). PRR активируются DAMPs, которые подобно своим микробным аналогам PAMPs действуют в качестве адьювантов. Тем не менее DAMPs не способны инициировать адаптивный иммунный ответ, если клетки не проявляют повышенной антигенности, то есть обладают антигенными эпитопами, которые ранее не вызывали толерантности (Galluzzi et al., 2017). Эти эпитопы могут кодироваться генами хозяина, которые мутируют в ходе онкогенеза и прогрессирования опухоли. То есть иммуногенность гибели опухолевых клеток зависит от комбинации антигенности (обеспечивается наличием эпитопов) и адьювантности (присваивается специфическими DAMPs) (Krysko and Vanenabeele, 2010).

Взаимодействие между DAMPs и рецепторами фагоцитоза, пуринергическими рецепторами и рецепторами распознавания образов (PRR) на

поверхности клеток врожденного иммунитета впоследствии вызывает защитные противораковые иммунные ответы *in vivo* (рис. 2).

Взаимодействие между DAMPs и рецепторами фагоцитоза, пуринергическими рецепторами и рецепторами распознавания образов (PRR) на поверхности клеток врожденного иммунитета вызывает защитные противораковые иммунные ответы *in vivo*. Противоопухолевая защита инициируется поскольку клетки врожденного иммунитета действуют как активаторы, стимулирующие антигенпрезентирующие клетки представлять антигены на молекулах МНС I и МНС II Т-клеткам и запускать Т-клеточный иммунный ответ против специфичных для рака антигенов (Galluzzi et al., 2020) (рис. 2).

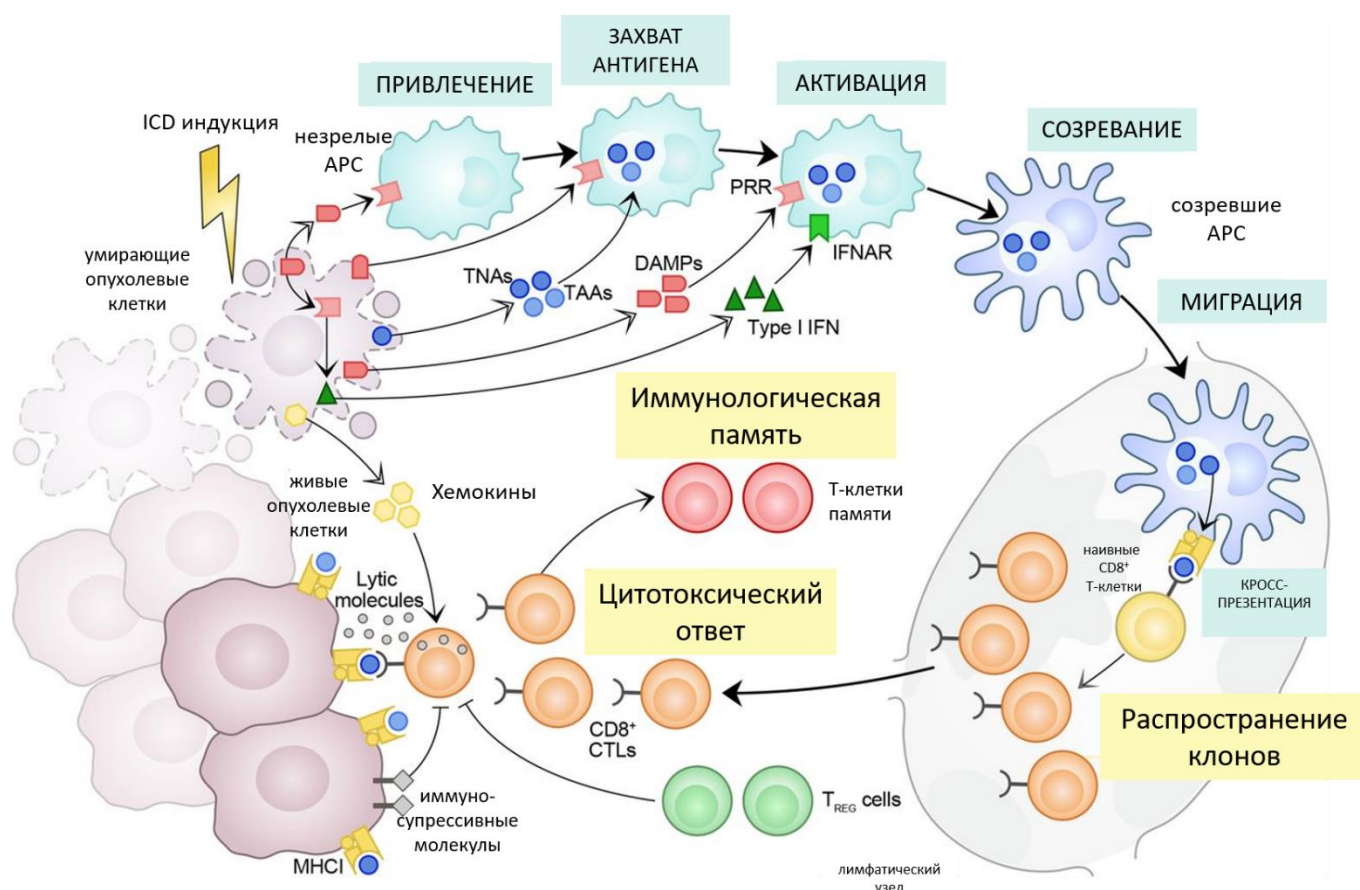


Рисунок 2. Основные факторы, определяющие иммуногенность гибели клеток: DAMPs, цитокины, хемокины, лиганд-связывающие рецепторы (Galluzzi et al., 2020)

Взаимодействие иммуногенных умирающих опухолевых клеток с дендритными клетками через DAMPs рассматривается как ключевой процесс, который превращает раковые клетки в противоопухолевые вакцины и опосредует очищение организма от всех раковых клеток, что делает ICD уникальной и невероятно полезной для лечения рака (Krysko et al., 2012; Tang et al., 2019).

Для установления активного иммунитета антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные клетки, действуют как основные регуляторы иммунного ответа. После поглощения антигенов опухоли и их процессинга дендритные клетки продуцируют провоспалительные цитокины, которые активируют опухолеспецифические цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), вызывая иммуноопосредованное уничтожение опухолевого очага (Garg et al., 2016). Однако статус созревания ДК определяет эффективность и конечный успех их взаимодействия с раковыми клетками, потому что только активированные и «заряженные» дендритные клетки могут обеспечивать полноценную стимуляцию Т-клеток, что позволяет вызвать мощный противораковый иммунитет (Vandenberk et al., 2015; Gard et al., 2016).

1.6. Фотодинамическая терапия онкологических заболеваний

Противоопухолевые эффекты фотодинамической терапии являются результатом трех взаимосвязанных механизмов - прямого цитотоксического воздействия на опухолевые клетки, повреждения сосудистой сети опухоли и индукции сильной воспалительной реакции, которая может привести к развитию иммунного ответа (Agostinis et al., 2011; Ormond and Freeman, 2013; Gomes-da-Silva et al., 2020).

Для фотодинамической терапии наиболее оптимальным является красный и инфракрасный свет, так как он проникает глубже в ткани по сравнению с синим (рис. 3). Однако генерировать $^1\text{O}_2$ может только свет с длиной волны до 800 нм,

поскольку более длинные волны имеют недостаточную энергию для инициирования фотодинамической реакции (Agostinis et al., 2011).

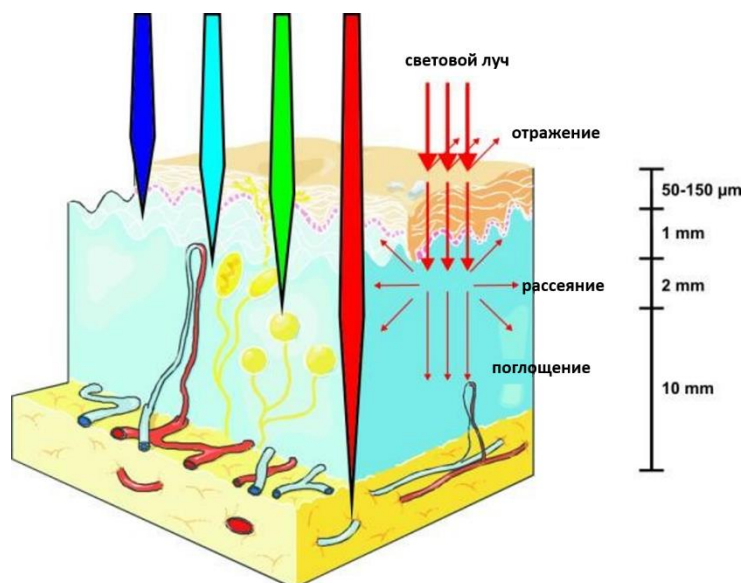


Рисунок 3. Распространение света разной длины волны в толще ткани (Agostinis et al., 2011)

Фотохимические превращения молекул происходят не в основном, а в электронно-возбуждённом состоянии. При поглощении света один электрон фотосенсибилизатора переходит на орбиту с более высокой энергией. В возбужденном состоянии (S_1) краситель очень нестабилен и излучает избыточную энергию в виде флуоресценции и / или тепла. Также возбужденный фотоагент может образовывать более стабильное триплетное состояние с временем жизни $10^{-4} - 10^{-2}$ (рис. 4).

Фотоактивированные молекулы могут вступать в окислительно-восстановительные реакции с образованием радикальных продуктов, либо реагировать с кислородом, переводя его в синглетную форму, которая окисляет биомолекулы. Реакции типа I происходит, когда фотосенсибилизатор реагирует непосредственно с органической молекулой, приобретая атом водорода или электрон с образованием радикала. Последующее окисление восстановленного фотоагента приводит к образованию смеси высокоактивных продуктов, вступающих в дальнейшие окислительные реакции.

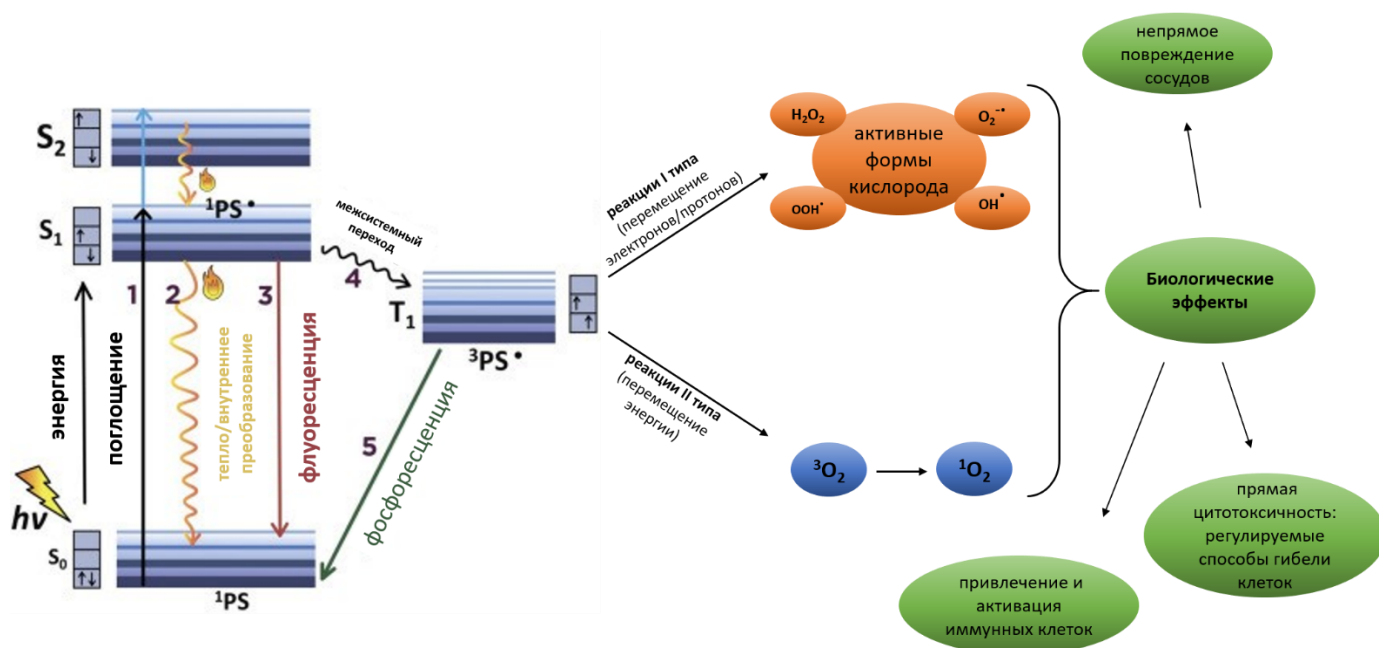


Рисунок 4. Механизм фотодинамической реакции на диаграмме Яблонского (Alzeibak et al., 2020)

Генерирование активных форм кислорода реакцией типа II отличается тем, что перенос энергии на кислород происходит сразу от фотовозбужденного красителя. Это переводит кислород в высокоактивное состояние, вследствие чего он может окислять разнообразные субстраты в клетке. Большинство фотосенсибилизаторов индуцируют реакции II типа (Agostinis et al., 2011).

Терапия рака фотодинамическим воздействием ограничена опухолями, которые возможно облучить дальним красным светом: это поверхностные опухоли либо опухоли полых внутренних органов. Достоинствами такого вида терапии является селективность, локальность, возможность сочетания с другими методами, во многих случаях неинвазивность. Оптимальный фотосенсибилизирующий агент должен представлять собой чистое соединение, позволяющее проводить анализ контроля качества при низких производственных затратах и хорошей стабильности при хранении (Agostinis et al., 2011). Он должен иметь высокий пик поглощения от 600 до 800 нм (от красного до инфракрасного), высокий квантовый выход триплетных состояний, быстрое и селективное накопление в опухолях, отсутствие

темновой токсичности и способность быстрого выведения из организма (Узденский, 2010).

Большинство фотосенсибилизаторов, используемых в терапии рака, основаны на тетрапиррольной структуре, подобной структуре протопорфирина, содержащегося в гемоглобине: хлорины, фталоцианины, феофорбиды и др. (Узденский, 2010; Agostinis et al., 2011).

Порфиразины широко используют в фотодинамической терапии злокачественных новообразований в качестве фотосенсибилизаторов и одновременно в качестве оптических сенсоров внутриклеточной вязкости. Известно, что внутриклеточная вязкость сильно возрастает в процессе фотоиндуцированной гибели клетки (Kuimova et al., 2009). Это создает основу для непосредственного контроля за процессом фотодинамического воздействия по изменению параметров флуоресценции фотосенсибилизатора, количественно связанных со значениями внутриклеточной вязкости. Такой подход впервые успешно осуществлен на клеточных культурах с использованием ранее полученного и описанного тетра(4-фторфенил)тетрацианопорфиразина (III) (Izquierdo et al., 2015).

Фотодинамическое действие способно активировать множественные пути гибели клеток, в том числе некроз и апоптоз. При этом один и тот же фотосенсибилизатор при разных режимах воздействия накапливается в разных клеточных структурах и запускает разные механизмы клеточной гибели или ведет к неконтролируемой смерти (Kessel et al., 1997).

ФДТ может приводить к небезопасной для организма (Asadzadeh et al., 2020) некротической гибели клеток, которая описывается как быстрая форма дегенерации, затрагивающая большое число клеточных популяций, и характеризующаяся набуханием цитоплазмы, разрушением органелл и плазматической мембраны. Это приводит к высвобождению внутриклеточного содержимого и последующему воспалению (Mroz et al., 2011).

Существуют фотосенсибилизаторы, которые вызывают иммуногенные формы клеточной смерти в опухолевых клетках (Adkins et al., 2015), например,

гиперицин (Galluzzi et al., 2017), BAM-SiPc, фотосенсибилизаторы на основе фталоцианина кремния (IV) (Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2021).

1.7. Фотодинамическая терапия как индуктор иммуногенной клеточной смерти

В течение последних 25 лет фотодинамическая терапия является клиническим вариантом лечения опухолей. Метод основан на введении фотосенсибилизатора, который после накопления в компартментах клетки фотоактивируется светом определенной длины волны (Dougherty et al., 1998; Agostinis et al., 2011). Длина волны, выбранная для фотодинамической терапии, обычно совпадает с самой длинной полосой поглощения фотосенсибилизатора, между 650 и 850 нм. Этот диапазон длин волн соответствует наибольшему проникновению в ткани, а также свету достаточной энергии для генерации возбужденных состояний, способных реагировать с молекулярным кислородом (Donohoe et al., 2019). В присутствии кислорода фотоактивированный сенсibilизатор приводит к образованию активных форм кислорода (АФК), которые обладают высокой цитотоксичностью для клеток. Основными АФК, генерируемыми в ФДТ, являются синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), образующийся при передаче энергии из триплетного состояния фотосенсибилизатора (реакции типа II) (Krasnovsky, 1998). Стимуляции фотодинамической терапией противоопухолевого иммунитета способствует долгосрочному контролю заболевания и является основным преимуществом по сравнению с традиционными методами лечения, включая хирургическое вмешательство или химиотерапию, которые являются иммунодепрессивными (Agostinis et al., 2011; Donohoe et al., 2019).

Многие из созданных фотосенсибилизаторов демонстрируют ограниченное поглощение в окне фототерапии и, как следствие, сниженную эффективность при лечении глубоких поражений. С некоторыми из этих фотосенсибилизаторов часто наблюдаются фоточувствительности кожи. Это приводит к необходимости

периодов без воздействия солнечного света для пациентов, что влияет на их качество жизни (Donohoe et al., 2019).

Создано несколько поколений фотоагентов. Фотосенсибилизаторы первого поколения (все на основе гематопорфирина) имеют ряд недостатков: медленно накапливаются в опухолевых клетках, имеют низкую терапевтическую эффективность и высокую фототоксичность, проявляющуюся на кожных покровах.

Фотосенсибилизаторы второго поколения обладают широкой полосой поглощения в дальней красной и ближней инфракрасной областях спектра (630 - 800 нм). Среди них наиболее перспективными считают производные хлорина: они нетоксичны, характеризуются высокой ФДТ активностью, очень контрастны и быстро выводятся из тканей. Третье поколение обладают большей селективностью и позволяют лечить более глубокие опухоли *in vivo* (Mishchenko et al., 2019).

Локализация цитотоксичного для опухоли агента является одним из ключевых факторов, определяющих первичные мишени при индукции смерти, а также определяет тип гибели клетки (Buytaert et al., 2007; Agostinis et al., 2011). Ранее, на примере гиперицин-опосредованной фотодинамической гибели клеток показано, что возможность развития иммуногенной клеточной гибели связана с локализацией фотосенсибилизатора в ЭПР и его способностью индуцировать так называемый стресс эндоплазматического ретикулума (Krysko et al., 2012a; Garg et al., 2012b).

Терапевтический исход фотодинамической терапии сильно зависит от клеточных и молекулярных механизмов, вызванных окислительным повреждением. Локализация фотосенсибилизатора во время облучения в клеточных компартментах определяет, где будет происходить окислительное повреждение и какой тип клеточной гибели будет протекать. Красители могут поступать во внутриклеточную среду как путем пассивной диффузии, так и активного эндоцитоза. Более гидрофобные фотосенсибилизаторы накапливаются в мембранах клеточных органелл и могут наблюдаться в эндоплазматической сети,

аппарате Гольджи и митохондриях, в то время как гидрофильные фотосенсибилизаторы чаще наблюдаются в эндоцитарных структурах. Накопление в аппарате Гольджи, ЭПР и митохондриях приводят к самым токсичными для клетки эффектам (Kessel., 2017).

Один и тот же фотосенсибилизатор может вызывать три механизма гибели клеток в зависимости от условий лечения. Как правило, высокое фотоповреждение (высокая концентрация фотосенсибилизатора и / или высокая доза света) вызывает некроз. Ожидается, что умеренное повреждение вызовет регулируемые условия гибели клеток (например, апоптоз). Наконец, незначительное повреждение вызывает аутофагию, наиболее вероятно адаптивную аутофагию, которая, в зависимости от степени повреждения, может дополнительно запускать другие механизмы регулируемой гибели клеток (Golstein and Kroemer, 2006; Galluzzi et al., 2017; Piette, 2015).

Индукция острого воспаления с помощью ФДТ привлекает нейтрофилы в обработанные фотодинамическим воздействием области опухоли, а они секретирует хемокины и гранулярные белки, чтобы стимулировать созревание и активацию дендритных клеток (Mroz et al. 2011). ДК мигрируют в лимфатические узлы, активируя Т-клетки и В-клетки, что приводит к активации адаптивного иммунного ответа (Brackett and Gollnick, 2011).

Иммунный ответ антиген-специфических Т-клеток - очень сложный и тщательно продуманный регуляторный процесс. Активация Т-клетки начинается с признания того, что рецептор антигена на поверхности Т-клетки (TCR) связывается с молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса в антигенпрезентирующей клетке (Toralian et al., 2016). Однако для эффективной активации Т-клеток требуются костимулирующие сигналы. Механизм запускается путем связывания молекул CD80 и CD86, экспрессируемых на поверхности дендритных клеток, с CD28, рецептором на поверхности Т-клетки, вследствие чего активируется секреция цитокинов (Toralian et al., 2016). Распознавание антигена через связывание TCR с комплексом МНС-эпитоп не приводит к активации Т-

клетки без костимулирующей передачи сигналов. Подавляют эту реакцию различные ко-ингибирующие молекулы, например цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 (CTLA-4) и лиганд запрограммированной смерти 1 (PD-L1) Т-клеток. Кроме того, когда CTLA-4 связывается с CD28 и деактивирует наивные Т-клетки или Т-клетки памяти, а PD-1 связывается с PD-L, для ограничения функционирования Т-клеток в периферических тканях (Demaria et al. 2005). Иммунная система контролирует общую активность Т-клеток посредством регулирования костимулирующих и ко-ингибирующих сигналов, что называется иммунной контрольной точкой.

1.8. Перспективы *in vivo* вакцинации мышей фотоиндуцированными клетками

Помимо успешных экспериментов *in vitro*, фотодинамическая терапия хорошо зарекомендовала себя в моделях противоопухолевой вакцинации на иммунокомпетентных мышах в качестве индуктора ICD (Casares et al., 2005; Humeau et al., 2019). В первых попытках вакцинации обработанных ФДТ клетками использовались лизаты и супернатанты клеток, которые действовали как профилактические вакцины, обеспечивая защиту мышей от роста опухоли. Такая противоопухолевая защита коррелирует с созревaniem дендритных клеток и продукцией IL-12 (Mitra et al., 2011, Donohoe et al., 2019). ФДТ с другими фотосенсибилизаторами, такими как хлорин (Korbelik and Merchant, 2012) и редапорфин (Gomes-da-Silva et al., 2018), исследовали для создания цельноклеточных фракций. В целом, эти исследования показали, что цельноклеточные вакцины на основе ФДТ являются опухолеспецифичными, что означает, что защита распространяется только на повторное заражение, проводимое теми же типами опухолевых клеток.

Еще одно исследование с использованием гиперицина в качестве фотоагента для ФДТ с участием клеток глиомы головного мозга (GL261) также продемонстрировало, что умирающие клетки могут эффективно активировать

созревание дендритных клеток (dendritic cells, DC) (Garg et al., 2016). Эксперименты по вакцинации показали, что вакцина из дендритных клеток, поглотивших гипериксин-ФДТ-обработанные опухолевые клетки, индуцировала противоопухолевый иммунный ответ, достаточно сильный, чтобы защитить около 70% мышей от повторного заражения головного мозга живыми раковыми клетками. Вместо этого вакцины из дендритных клеток, поглотивших замороженный и оттаянный опухолевый материал (Freeze/Thaw, FT), не обеспечивали никакой противоопухолевой защиты. Помимо этого, вакцины на основе дендритных клеток показали перспективность лечения глиомы (Garg et al., 2016).

2.1. Объект исследования

Исследование выполнялось с использованием постоянных клеточных линий глиомы мыши GL261 и фибросаркомы мыши MCA205; а также первичных культур дендритных клеток костного мозга мышей линии C57BL/6J. Культивирование опухолевых линий проводилось согласно паспорту культуры, для дендритных клеток использовался протокол Love Aaes et al., 2016. Работы с культурами клеток проводились в специально оборудованных стерильных помещениях, культивирование производилось в условиях CO₂-инкубатора с постоянным поддержанием температуры 35°C и 5%CO₂.

В качестве *in vivo* объектов использовались мыши линии C57BL/6J и Nude. Животные содержались в сертифицированном виварии Национального исследовательского Нижегородского государственного университета, и исследовательская работа проводилась в соответствии с требованиями приказом №267 МЗ РФ от 19.06.2003, а также в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» и отвечали требованиям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов, и были согласованы с биоэтической комиссией ННГУ.

2.2. Материалы исследования

В работе изучались следующие фотоагенты: фотосенс (Ниопик, Россия), фотодитазин (Вета-гранд, Россия), тетра(арил)тетрацианопорфиразины, а именно порфиразин I (фенантрен, pz I) и порфиразин III (фторбензил-О-фенил, pz III) (разработанные и предоставленные ИМХ РАН).

Все тетрапиррольные соединения: и фотосенс, и фотодитазин, и порфиразины I и III – имеют в спектре максимумов поглощения в коротковолновой области спектра (полоса Sore) и длинноволновой области (Q-полоса) (рис. 5). Фотодитазин характеризуется преобладанием коротковолновой полосы Sore, что типично для группы хлориновых фотосенсибилизаторов. В случае порфиразинов,

обладающих свойствами молекулярных роторов и, как следствие, характеризующихся очень низким квантовым выходом флуоресценции в низковязких средах, измерения были проведены в глицериновых растворах (Шилягина, 2014).

Зафиксированы следующие значения максимумов поглощения фотосенсибилизаторов (λ_{abs} , нм): Фотосенс – 678 нм, Фотодитазин – 643 нм в водных растворах.

Понимание спектральных характеристик фотосенсибилизаторов позволило подобрать оптимальные условия индукции клеток в присутствии фотоагентов. Для активации молекул фотосенсибилизаторов необходим свет длины волны, который покрывает пики поглощения. В работе использовался ранее разработанный светодиодный излучатель для высокопроизводительного скрининга и исследования свойств потенциальных фотосенсибилизаторов в системе *in vitro* [патент на полезную модель РФ № 150108 и №151289]. Излучатель обеспечивает равномерный световой поток при контроле температуры среды и возможности варьирования дозы и мощности облучения. Сменные LED матрицы позволяют использовать излучение в разных спектральных диапазонах. Используемая длина волны для проведения экспериментов 630 нм [патент на полезную модель РФ № 0002621710].

Устройство представляет собой малогабаритный портативный светодиодный излучатель высокой мощности с принудительным воздушным охлаждением. Облучатель предназначен для проведения процедур облучения культуральных чашек Петри диаметром до 60 мм. Расчётная рабочая плоскость устройства расположена на расстоянии 30 мм от верхнего края линз светодиодных источников. Величина интенсивности излучения фиксирована и составляет около 24 мВт/см². Скорость набора дозы составляет 1,44 Дж/(см² х мин).

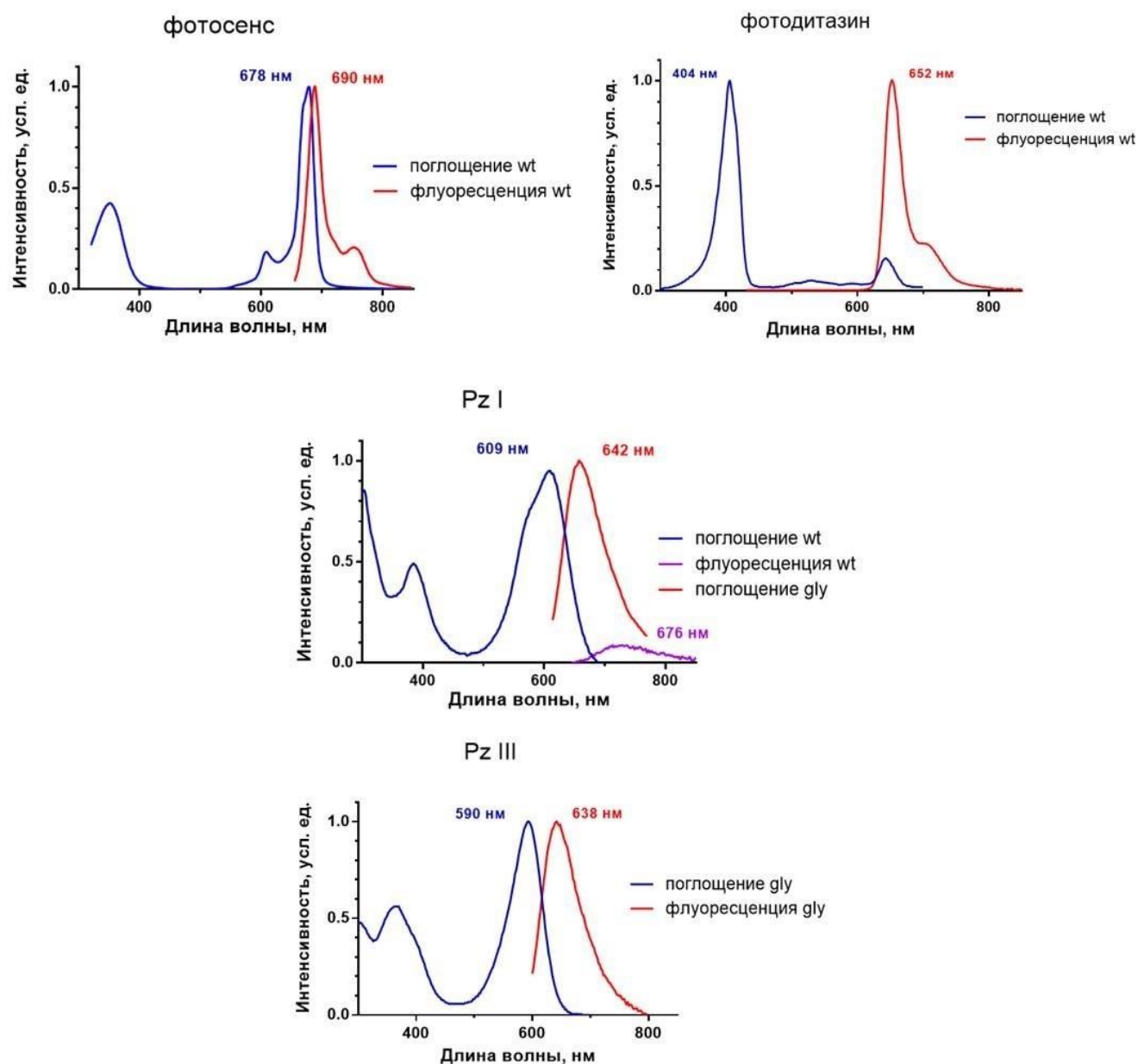


Рисунок 5. Спектральные характеристики фотосенсибилизаторов

2.3. Методы

2.3.1. Культивирование опухолевых линий

Клетки линии GL261 культивировали согласно паспорту культуры в среде DMEM с добавлением 4.5 г/л глюкозы (ПанЭко, Россия), 2мМ глутамина (ПанЭко, Россия), 0.11 г/л пирувата натрия (Life Technologies, США) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (fetal bovine serum, FBS) (ПанЭко, Россия). По завершении периода экспоненциального роста, клетки снимали раствором версен-трипсина

(3:1) и пересевали. Кратность рассева составляла 1:10, плотность посева – $1 \cdot 10^5$ клеток/мл.

Клетки фибросаркомы мыши МСА205 культивировали согласно паспорту культуры в среде RPMI с добавлением 4.5 г/л глюкозы (ПанЭко, Россия), 2мМ глутамин (ПанЭко, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия). По завершении периода экспоненциального роста, клетки снимали раствором версен-трипсина (3:1) и пересевали. Кратность рассева составляла 1:5, плотность посева – $1 \cdot 10^5$ клеток/мл.

Экспериментальные работы с клетками проводили после третьего пассажа. Жизнеспособность культур поддерживалась в условиях CO₂-инкубатора Shellab (Sheldon Manufacturing, США) при температуре 35.5°C и газовой смеси, содержащей 5% CO₂ (Черкасова и Брилкина, 2015).

2.3.2. Индукция клеточной смерти

Гибель клеток была вызвана фотодинамической терапией (фотодинамическим воздействием, ФДТ) с применением фотосенса, фотодитазина, порфиразина I или порфиразина III. Клетки GL261 или МСА205 инкубировали с фотосенсибилизатором в течение 4 часов в бессывороточной среде и после облучали дозой 20 Дж/см² в полной культуральной среде, не содержащей фотосенсибилизаторов. Клетки, загруженные фотосенсибилизаторами, обрабатывали в темном или приглушенном свете.

В экспериментах применялось два вида культурального пластика: 96 луночные планшеты, на которые высаживалось $6 \cdot 10^3$ клеток на лунку и 60-мм чашки Петри, на которые высаживалось $3 \cdot 10^5$ опухолевых клеток (рис. 6).

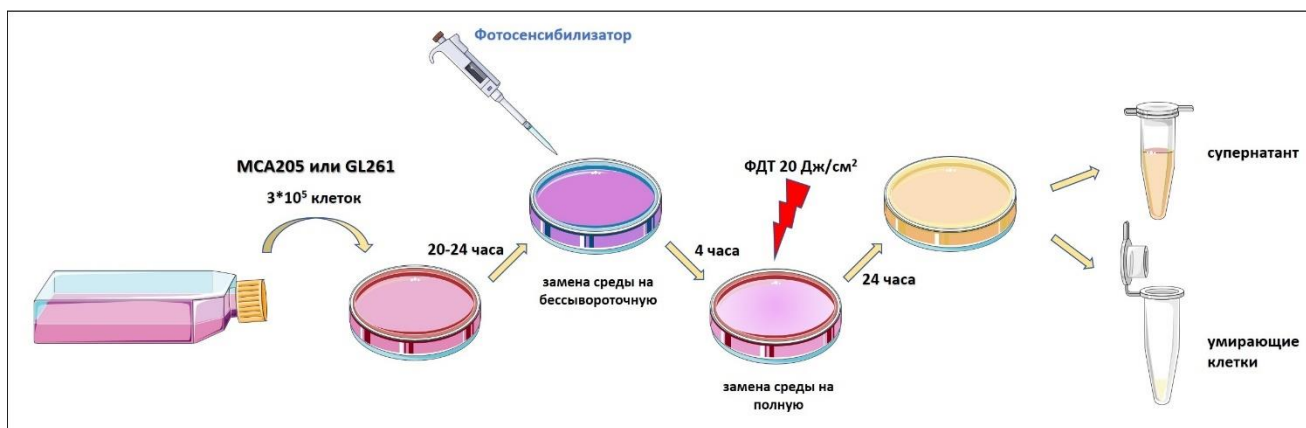


Рисунок 6. Схема индукции опухолевых клеток с применением исследуемых фотосенсибилизаторов

2.3.3. Оценка цитотоксичности фотосенсибилизаторов МТТ-тестом

Оценка цитотоксичности соединений осуществлялась через 24 часа после индукции клеточной смерти методом анализа метаболической активности клеток с использованием МТТ-теста. В бессывороточную среду культивирования вносили тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид в концентрации 0,5 мг/мл. При участии НАДН-зависимых дегидрогеназ живых клеток происходит восстановление красителя до окрашенного водонерастворимого формазана. Через 4 часа культуральную среду отбирали и кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Оптическую плотность раствора измеряли с использованием комбинированного планшетного спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy Mx (BioTek Instruments Inc., США) на длине волны 570 нм.

2.3.4. Анализ процента гибели популяций опухолевых клеток после индукции клеточной смерти

Для установления процента погибающей клеточной популяции был проведен цитофлуориметрический анализ. Окраской FITC Annexin V (Invitrogen) и DAPI (Thermo Fisher Scientific) или Sytox Blue Nucleic Acid Stain (Molecular probes) определялся процент окрашенной обоими красителями популяции. Клетки

отбирались с культурального пластика через 24 часа после фотоиндукции. Клетки дважды промывались холодным PBS, содержащим 1% FBS. Далее ресуспендировались в связывающем буфере (Annexin V binding buffer): 10 mM Hepes, pH 7,4, 0,14 mM NaCl и 2,5 mM CaCl₂. Клетки окрашивались 1 мкМ Sytox Blue или DAPI и на каждые $1 \cdot 10^5$ клеток добавлялось 5 мкл Annexin V, Alexa Fluor 488. Анализ выполняли на проточном цитометре BD FACSCanto. Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения FlowJo.

2.3.5. Оценка скорости поступления фотосенсибилизаторов в опухолевые клетки

Оценка скорости поступления фотодинамических агентов в клетки выполнена методом конфокальной микроскопии с использованием системы Axio Observer Z1 LSM-710 DUO NLO и Axio Observer LSM-800 (Carl Zeiss, Германия).

Клетки глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205 рассевали на тонкодонные 96-луночные планшеты (Corning, USA) в количестве $1 \cdot 10^4$ клеток на лунку и инкубировали в течение ночи. Затем среду заменяли на бессывороточную, содержащую исследуемый фотосенсибилизатор в концентрации 10 мкМ. В случае фотосенса и фотодитазина через 1, 2, 3 или 4 часа среду с фотосенсибилизатором заменяли на свежую бессывороточную среду и проводили микроскопический анализ флуоресценции клеток. В случае фотосенсибилизаторов порфиразинового ряда проводили безотмывочный мониторинг: после добавления среды с фотосенсибилизаторами получали изображения клеток через каждый час в течение 4 часов. Возможность безотмывочного мониторинга обусловлена сильной зависимостью фотофизических характеристик, выбранных для исследования порфиразинов от вязкости. В низковязкой среде эти красители практически не флуоресцируют, а после поступления в клетки регистрируется существенное усиление сигнала.

Флуоресценцию фотосенса и фотодитазина возбуждали на 633 нм и регистрировали в диапазоне 650-735 нм. Флуоресценцию порфиразинов регистрировали в диапазоне 600-670 нм при возбуждении на 594 нм.

2.3.6. Анализ субклеточной локализации фотосенсибилизаторов

Для установления субклеточной локализации фотосенсибилизаторов был проведен колокализационный анализ с флуоресцентными красителями, специфически маркирующими различные клеточные органеллы.

Клетки глиомы рассеивали на тонкодонные 96-луночные планшеты (Corning, USA) в количестве $1 \cdot 10^4$ клеток на лунку и инкубировали в течение ночи. Затем среду заменяли на бессывороточную среду, содержащую исследуемый фотосенсибилизатор в концентрации 10 мкМ и инкубировали в течение 4-х часов. За 30 минут до окончания инкубации к клеткам добавляли краситель, окрашивающий лизосомы (LysoTracker Green), митохондрии (MitoTracker Green) или эндоплазматический ретикулум (ER-Tracker) в концентрации 0,5 мкМ. По окончании инкубации среду с фотосенсибилизатором и красителем органелл заменяли на свежую бессывороточную.

В случае с анализом накопления фотосенсибилизаторов в аппарате Гольджи, окрашивание проводилось по окончании инкубации с фотосенсибилизатором. Среду с фотосенсибилизатором заменяли на среду с красителем аппарата Гольджи (BODIPY FL C5-ceramide) в концентрации 5 мкМ и инкубировали в течение 30 минут при температуре 4°C. Затем производили замену среды на свежую и инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C.

На полученных изображениях колокализация используемого фотосенсибилизатора и красителя, специфично окрашивающего ту или иную органеллу, подтверждалась путем сравнения профилей распределения сигнала в соответствующих флуоресцентных каналах.

2.3.7. Анализ цитотоксичности фотосенсибилизаторов

Клетки глиомы мыши GL261 и фибросаркомы мыши MCA205 высаживали на 96-луночные культуральные планшеты в количестве $6 \cdot 10^3$ на лунку. Для определения токсичности тестируемых соединений через сутки проводили замену культуральной среды на бессывороточную среду, содержащую исследуемые соединения в концентрациях от 0,001 до 70 мкМ. По истечении 4-х часового периода инкубации в условиях CO₂-инкубатора среда с фотосенсибилизаторами заменяли среду на полноценную ростовую среду. Анализ жизнеспособности проводили при помощи МТТ-теста.

2.3.8. Определение типа клеточной смерти при фотодинамическом воздействии методом ингибиторного анализа

Для установления типа клеточной смерти малигнизированных клеток при фотодинамическом воздействии использовались соединения, избирательно блокирующие развитие апоптоза, некроптоза и ферроптоза (Grootjans et al., 2016). Для ингибирования развития апоптоза использован панкаспазный ингибитор zVAD-fmk (карбобензокси-валил-аланил-аспартил-[О-метил]-фторметилкетон), необратимо связывающийся с активным центром аспарат-специфичных цистеиновых протеаз данной группы (Merck KGaA, Sigma-Aldrich). Для ингибирования некроптоза использован аллостерический ингибитор киназы RIP1 некростатин-1s (necrostatin-1s) (Abcam, США) (Degterev et al., 2005). В качестве ингибиторов развития ферроптоза использовали ферростатин-1 (ferrostatin-1) (Merck KGaA, Sigma-Aldrich), активность которого в первую очередь связывают со свойствами ловушки липидных радикалов, и хелатор железа дефероксамин (DFO) (Merck KGaA, Sigma-Aldrich).

Клетки глиомы рассевали на 96-луночные планшеты в количестве $6 \cdot 10^3$ клеток на лунку и инкубировали в течение ночи. После этого проводилась замена культуральной среды на среду, содержащую фотосенсибилизатор в концентрации равной установленной IC₅₀. В ряде случаев в среду вносились ингибиторы

клеточной смерти в концентрациях 25 мкМ (zVAD-fmk), 20 мкМ (некростатин-1s), 1 мкМ (ферростатин-1) и 10 мкМ (DFO). Выбор действующих концентраций ингибиторов осуществлен на основе анализа опубликованных данных о их активности и рекомендаций производителей. По истечении 4-х часовой инкубации проводили замену среды на полную среду без фотосенсибилизаторов, содержащую в соответствующих вариантах обработки ингибиторы клеточной гибели в перечисленных выше концентрациях.

Затем проводилось облучение с помощью светодиодного излучателя в дозе 20 Дж/см². Оценка жизнеспособности культур клеток осуществлялась через 13 часов методом анализа метаболической активности клеток с использованием МТТ-теста.

2.3.9. Анализ высвобождения HMGB1 умирающими клетками

Клетки инкубировались после фотодинамического воздействия в течение 18-20 часов. Супернатант клеток отбирался в отдельную пробирку и центрифугировался 3 минуты на 14 тыс. об/мин. После вся надосадочная жидкость отбиралась в чистую пробирку.

Для ИФА анализа использовался набор HMGB1 ELISA kit (IBL-Hamburg) - иммуноферментный анализ для количественного определения HMGB1. Лунки микротитровальных планшетов покрыты очищенным антителом против HMGB1. В анализе используется 10 мкл супернатанта образца. HMGB1 в образце специфически связывается с иммобилизованным антителом и распознается вторым антителом, меченным ферментом. После реакции субстрата концентрация HMGB1 определяется измерением оптической плотности образца на длине волны 450 нм.

2.3.10. Количественный анализ АТФ во внеклеточной среде после индукции клеточной смерти

Клетки глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205 были подвергнуты фотодинамическому воздействию согласно вышеописанному протоколу. Инкубация клеток после фотодинамического воздействия проводилась в среде, содержащей 2% FBS. Через 24 часа после проведения ФДТ культуральную среду собирали и очищали от умирающих опухолевых клеток посредством центрифугирования при 1500 rpm при 4°C в течение 3 минут. Количественное определение исследуемого АТФ определяли набором для анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® (Promega, G7571) в соответствии с инструкциями производителей. Люминесцентный сигнал измеряли на планшетном ридере Tecan Spark.

2.3.11. Анализ экспонирования кальретикулина на поверхности фотодинамически индуцированных клеток

Клетки глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205 были подвергнуты фотодинамическому воздействию согласно вышеописанному протоколу. По истечении 1,5, 3-х и 24 часовой инкубации или сразу после ФДТ воздействия клетки снимались с субстрата культивирования посредством обработки 0,25% раствором трипсина-ЕДТА (Life Technologies, США) и помещались на лед. Далее клетки промывали ледяным FACS буфером (PBS с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина и 2% эмбриональной телячьей сыворотки) и центрифугировались в режиме 1500 rpm при 4°C в течение 5 минут. Осадок ресуспендировали в ледяном FACS буфере с добавлением антител к кальретикулину (rabbit, ab210431; 0.5 мг/мл) или изотип-контроля IgG (rabbit, ab208150, 0,5 мг/мл) и инкубировали при 4°C в течение 40 минут. Затем добавляли 200 мкл охлажденного FACS буфера, содержащего 0.8 мкМ ДНК-специфичного красителя Sytox Green (Molecular Probes, S7020). Образцы анализировали методом проточной цитометрии с использованием BD FACSCanto (США). Полученные

результаты обрабатывались в программе FlowJo (v.10.0.8). Поверхностный кальретикулин определяли для Sytox Green негативных клеток.

2.3.12. Изоляция и культивирование дендритных клеток

Мышь умерщвляли путем дислокации шейных позвонков. Далее изолировали задние конечности мышей: бедра и голени. После этого работа проводилась в стерильных условиях. Ткань и кости обрабатывали 70% спиртом. Мягкие ткани убирали, не поврежденные кости промывали в фосфатно-солевом растворе и культуральной среде. Кости сохраняли в холодном растворе HBSS. Далее оба эпифиза кости надламывали, в полость кости вводили иглу и средой RPMI с 5% содержанием сыворотки вымывали клетки костного мозга в чашку. Клетки диссоциировали в небольшом объеме жидкости (до 25 мл).

Фильтровали клетки через нейлоновый клеточный фильтр (100 мкм) в пробирку на 50 мл. Клетки центрифугировали при 1700 rpm 7 мин, 4 ° C.

Клетки ресуспендировали в буфере для лизиса эритроцитов. Далее, инкубировали в течение 4 минут в темноте, периодически взбалтывая. В суспензию добавляли охлажденный HBSS и снова центрифугировали. Осадок ресуспендировали в RPMI среде с добавлением 20 нг/мл GM-CSF, 1% L-глутамин, 1% пирувата натрия, 1% антибиотика, 50мкМ β-меркаптоэтанола и 5% сывороткой. Культуры высевали в неадгезионные культуральные чашки Петри по концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток на чашку в 10 мл питательной среды. Культивировали дендритные клетки при 37° C, 5% CO₂ в условиях CO₂ инкубатора. На 3, 6 и 9 день проводилась частичная замена среды на свежую для обеспечения эффективного роста и деления клеток.

2.3.13. Анализ фагоцитирующей активности дендритных клеток

Для определения активации фагоцитоза в дендритных клетках проведено сокультивирование первичных культур дендритных клеток костного мозга с

клетками глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205, подвергшихся фотодинамическому воздействию. Индукция клеточной гибели осуществлялась по вышеописанной методике с дополнительной окраской клеток перед индукцией Cell Tracker Green CMDFA (1 мкМ) для визуализации клеток-мишеней (Love Aaes et al., 2016). После 24 часов инкубации дендритные клетки сокультивировались с умирающими/мертвыми клетками в соотношении 1:1 и 1:5 в течение 2 часов. Клетки отбирались, промывались холодным FACS-буфером, иммуноокрашивались PE-Cy7-анти-CD11c (BD PharMingen) и Fc-блоком. Процент популяции дендритных клеток CD11+CellTracker+ анализировался проточной цитометрией с использованием BD FACSCanto (США) (Брилкина, 2014).

2.3.14. Определение фенотипического статуса дендритных клеток после сокультивирования с фотоиндуцированными опухолевыми клетками

С целью определения функционального статуса антиген-презентирующих клеток в присутствии опухолевых, погибающих в результате фотодинамического воздействия, было проведено совместное культивирование первичных культур дендритных клеток костного мозга с ФДТ-умирающими клетками GL261 и MCA205 в соотношении 1:1, 1:5 или 1:10. Время сокультивирования составило 18-20 часов (рис. 7). В качестве положительного контроля выступали дендритные клетки, которые были стимулированы липополисахаридом *E. coli* (ЛПС) в концентрации 100 нг/мл. В группу негативного контроля входили культуры ДК, совместно культивированные с опухолевыми клетками, убитые несколькими циклами заморозки/оттаивания (F/T). По истечении периода совместного культивирования клетки собирали, центрифугировали ($400 \times g$, 6 минут, 4°C) и однократно промывали в фосфатно-солевом буферном растворе. Мертвые клетки были исключены из анализа с помощью метода проточной цитометрии с использованием ДНК-специфичного маркера SYTOX Blue (Molecular Probes, S11348).

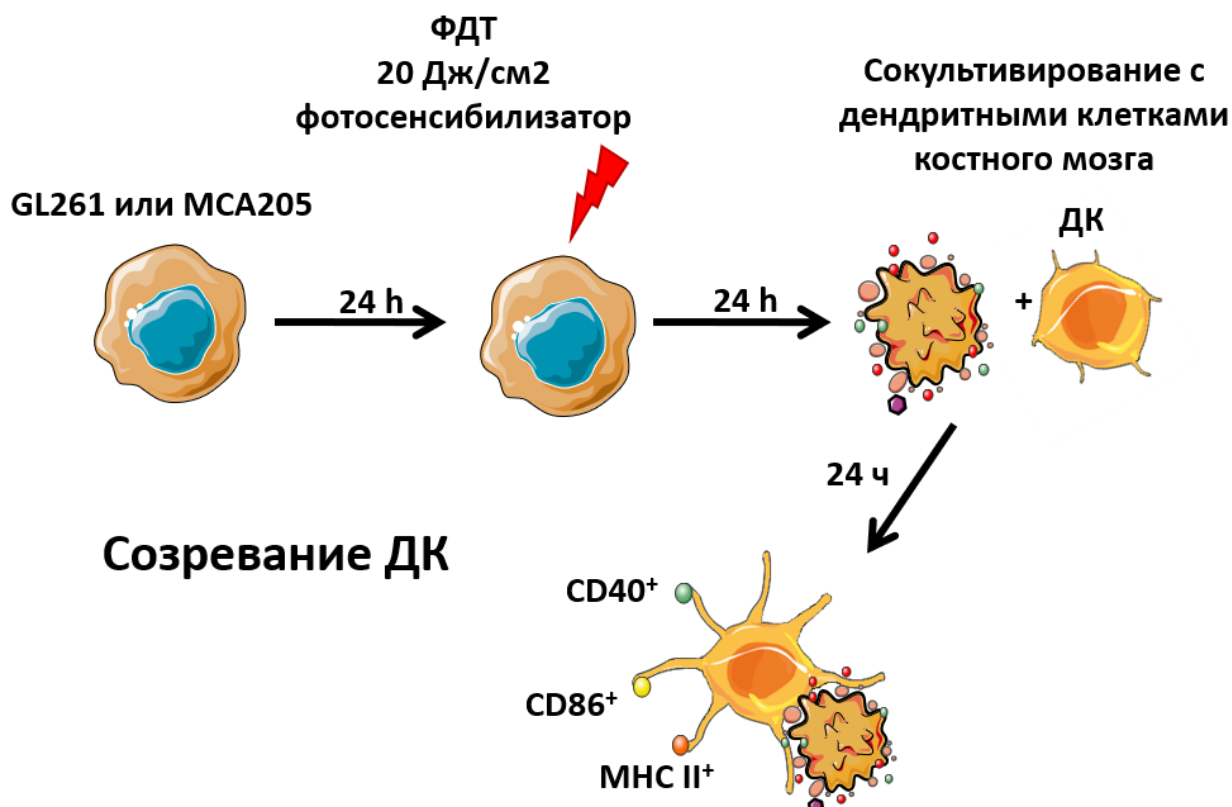


Рисунок 7. Схема сокультивирования дендритных клеток костного мозга мыши с умирающими фотоиндуцированными клетками и определение фенотипического образа ДК

Степень созревания дендритных клеток оценивали методом иммуноокрашивания ко-стимулирующих молекул, экспрессирующихся на поверхности дендритной клетки, с использованием следующих флуоресцентных маркеров: PE-Су-анти-CD11c (BD PharMingen), APC- или eFluor 450-anti-CD86 (eBioscience), Pacific Blue-anti-CD40 (Biolegend), FITC-anti-MHCII (eBioscience) и мышинный фрагмент Fc (Thermo Fisher Scientific).

2.3.15. Исследования продукции IL-6 при сокультивировании антиген-презентирующих клеток с фотоиндуцированными опухолевыми клетками

В супернатантах культур дендритных клеток, сокультивируемых с умирающими опухолевыми клетками фибросаркомы мыши, определяли содержания IL-6 методом иммуноферментного анализа (BioLegend).

Супернатанты отбирались через 24 часа после сокультивирования: клетки осаждались центрифугированием ($400 \times g$, 6 минут, 4°C), надосадочную жидкость замораживали при -20°C . Образцы не подвергались оттаиванию/замораживанию больше двух раз.

2.3.16. Анализ иммуногенности ФДТ *in vivo*

Анализ иммуногенности терапии на основе выбранных фотосенсибилизаторов был проведен с использованием модели профилактической противоопухолевой вакцинации мышей. Опухолевые клетки фибросаркомы мыши MCA205 или глиомы мыши GL261 индуцировались согласно вышеописанному протоколу и инкубировались в течение 24 часов. После суспензия умирающих/мертвых клеток отбиралась с чашек, клетки осаждались центрифугированием, осадок расуспендировался в фосфатно-солевом растворе в концентрации $2,5 \times 10^4$ клеток/мкл. Самкам мышей линии C57BL/6J подкожно в левый бок инъецировали опухолевые клетки, умирающие вследствие фотодинамического повреждения, в количестве 5×10^5 клеток в 200 мкл PBS. Дважды вакцинация проводилась в модели превентивной вакцинации от глиомы. Контрольной группе осуществлялась инъекция PBS или опухолевые клетки MCA205 или GL261, подверженные трем циклам замораживания и оттаивания (F/T). На 8 день после вакцинации в другой бок мыши подкожно была привита опухоль той же природы: живые клетки в количестве 1×10^5 клеток (рис. 8).

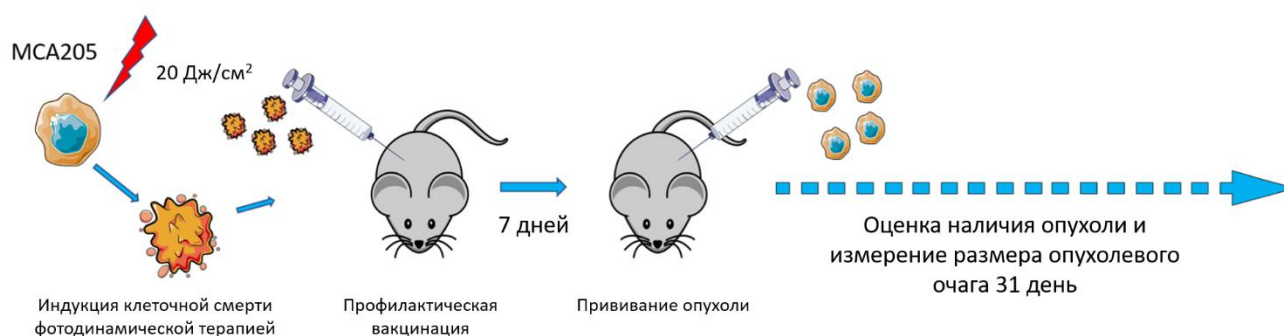


Рисунок 8. Схема профилактической вакцинации мышей фотоиндуцированными клетками MCA205

Контроль роста опухоли осуществлялся при помощи электронного штангенциркуля в течение последующих 3-4 недель. Размер опухолей рассчитывали по формуле, предложенной Humeau et al., 2018:

$$\text{Объем опухоли} = \frac{L * l * h * \frac{4\pi}{3}}{8} (\text{мм}^3), \text{ где } L - \text{ширина, } l - \text{длина, } h - \text{высота.}$$

Эвтаназию животных проводили в случае появления выраженных некротических процессов или при увеличении объема опухоли 2000 мм³.

2.3.17. Подготовка вакцины на основе дендритных клеток in vitro

Основу дендритноклеточной вакцины составляли изолированные культуры ДК костного мозга самок мышей линии C57BL/6J возраста 6-8 недель. На 9-10 день культивирования клетки отбирались для сокультивирования.

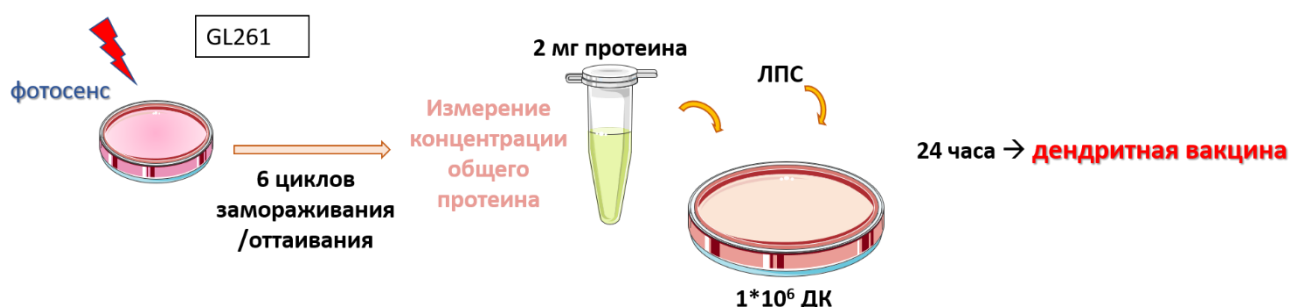


Рисунок 9. Схема создания дендритной вакцины на основе фотоактивированных клеток глиомы мыши GL261

Опухолевые клетки глиомы мыши GL261 были индуцированы по вышеописанному протоколу и инкубировались 24 часа. После клетки подвергались 6 циклам замораживания при -80°C и оттаиванию на водяной бане при 55°C. В собранном клеточном лизате было измерено количество общего протеина с использованием коммерческого набора BCA measurement (Sigma-Aldrich) и спектрофотометра Synergy MX (BioTek Instruments Inc., США). 2 мг протеина добавлялось к суспензии 10*10⁶ дендритных клеток на 90 минут.

С целью гиперактивации дендритных клеток, далее была проведена 24-часовая инкубация клеток с липополисахаридом (0,5 мкг/мл) (рис. 9). В качестве контроля выступали дендритные клетки, инкубированные с лизатами клеток глиомы GL261, подвергнутыми нескольким циклам заморозки/оттаивания (F/T) без фотоиндукции.

2.3.18. Анализ иммуногенных свойств дендритноклеточной вакцины на модели глиомы головного мозга мыши *in vivo*

Для анализа эффективности профилактической дендритноклеточной вакцинации на основе ФДТ-индуцированных клеток глиомы мышам линии C57BL/6 была проведена двукратная внутрибрюшинная инъекция дендритными клетками в количестве $1 \cdot 10^6$ с перерывом в 7-8 дней. Через 7 дней после последней вакцинации проведена интракраниальная инъекция жизнеспособных клеток глиомы GL261 (рис. 10).



Рисунок 10. Схема профилактической вакцинации от глиомы головного мозга дендритноклеточной вакциной

Инъекция осуществлялась при помощи стереотаксической установки 2 мм латеральнее и 2 мм кзади от брегмы и на 3 мм ниже твердой мозговой оболочки согласно работе Garg et al., 2016. В постоперационном периоде у животных оценивался неврологический статус и динамика роста опухоли методом МРТ.

2.3.19. Магнитно-резонансная томография

Магнитно-резонансную томографию выполняли на высокопольном магниторезонансном томографе Agilent Technologies DD2-400 9.4 T (400 MHz) (Англия) с объемной катушкой M2M (H1). Подогрев животных осуществлялся теплым воздухом с температурой 27°C. Животные находились под общей анестезией (золетил 0,2 мг в/м и ксиланит 05 мг в/м), в режиме T1 взвешенного изображения (ВИ). Размещение животного происходило вертикально с использованием держателя для фиксации животного внутри томографа. При проведении исследования мышь находилась неподвижно-закреплённой внутри туннеля магнита аппарата около 40 минут. Для получения и обработки результатов использовалась программа VnmrJ.

Послойные срезы в фронтальной плоскости с получением T1-томограмм, взвешенных по протонной плотности, осуществляют, применяя импульсную последовательность MGEMS (multi gradient echo multi slice, «разноградиентное многослойное эхо») с параметрами: TR=1000 мс, TE=1.49мс, количество эхо – 6, FOV – 20x20 мм, матрица – изначально использовалась 128x128, а затем 256x256, толщина среза – 1 мм, количество срезов – 15, время сканирования – 17мин 04 с.

2.3.20. Статистический анализ

Статистический анализ был выполнен в программе GraphPad Prism (v.6.0). Для выбора статистического критерия использовался тест Д'Агостино-Пирсона на нормальность. Выживаемость клеток при ингибировании разных путей клеточной смерти анализировали при помощи t-критерия Уэлча. В экспериментах, в которых проводился количественный анализ высвобождения DAMPs и анализ фагоцитоза проводился с помощью теста Манна-Уитни. Для оценки созревания использовали t-критерий для независимых выборок с использованием критерия Уэлча или тест Манна-Уитни. Кривые выживаемости Каплана-Мейера, показывающие график развития опухоли, анализировали с помощью лог-рангового теста Мантела-Кокса. Различия между объемами опухолей в экспериментах по профилактической

вакцинации против опухолей *in vivo* анализировали с помощью непараметрического критерия Уилкоксона.

3. Результаты и их обсуждение

В работе были проведено исследование способности фотосенсибилизаторов запускать иммуногенную клеточную смерть в опухолевых клетках. Для этого были оценены ответы опухолевых клеток на индукцию фотоагентами при фотодинамическом воздействии, их способность активировать молекулярные маркеры иммуногенной клеточной смерти, такие как экспонирование кальретикулина на наружной поверхности клеточной мембраны, высвобождение свободного АТФ и HMGB1. Помимо этого, оценена фагоцитирующая активность и фенотипические изменения антигенпрезентирующих клеток в присутствии клеток глиомы GL261, погибающих в результате ФДТ. Для подтверждения универсальности выявляемых закономерностей, были оценены эффекты фотодинамической терапии с применением исследуемых фотосенсибилизаторов на клетки постоянной клеточной линии фибросаркомы мыши MCA205, широко применяемой в экспериментальных исследованиях механизмов иммуногенной клеточной смерти. В *in vivo* экспериментах показана возможность активировать адаптивный иммунитет животных после иммунизации вакцинами на основе ФДТ-индуцированных клеток.

1. Анализ скорости накопления фотосенсибилизаторов в опухолевых клетках

Важность понимания скорости накопления объясняется тем, что необходимо подобрать условия инкубации клеток с фотосенсибилизатором без последствий долгой темновой токсичности. Но при этом, максимум активных фотосенсибилизирующих молекул должны вступать в реакции на свету во внутренней среде клетки. Проведен анализ скорости накопления фотоагентов в клетках линий фибросаркомы мыши MCA205 и глиомы мыши GL261.

Все исследованные красители легко поступают внутрь клетки при инкубации в культуре *in vitro*, при этом скорость отличается для клеток глиомы и

фибросаркомы мыши, что объясняется разной метаболической активностью этих типов клеток.

Существуют два пути поступления красителей внутрь клетки: диффузионный и в результате эндоцитоза (по А.Б.Узденскому). Если небольшой объем внеклеточной жидкости захватывается внутрь эндоцитозных пузырьков, транспортируемых в клетку, то краситель попадает преимущественно в лизосомы и другие везикулярные структуры. Так как это активный вид транспорта, накопление происходит за счет энергии АТФ.

Проникновение фотоагента во внутриклеточную среду и его локализация в компартментах клетки сильно зависят от размеров молекулы, ее полярности, способности образовывать водородные связи (Uzdensky et al., 2001). От времени инкубации зависит распределение фотосенсибилизатора по субклеточным компартментам также, как и от наличия в культуральной среде сыворотки крови (Boyle and Dolphin, 1996).

Сильная зависимость квантового выхода флуоресценции порфиразинов от вязкости среды позволила применить безотмывочный подход для оценки скорости их поступления: значительные отличия в вязкости водной среды и клеточных структур (мембраны, цитоплазма) приводят к тому, что при поступлении в клетку происходит «разгорание» красителя. При постоянном присутствии красителя в среде, где он практически не флуоресцирует, увеличение сигнала в клетке является характеристикой поступления красителя. Среди исследованных порфиразинов наибольшую скорость интернализации показал порфиразин I (рис. 11). Необходимо отметить, что различие в спектральных свойствах, а также возможные различия в вязкостной чувствительности могут повлиять на регистрируемую динамику и не позволяют исследовать абсолютное содержание красителя.

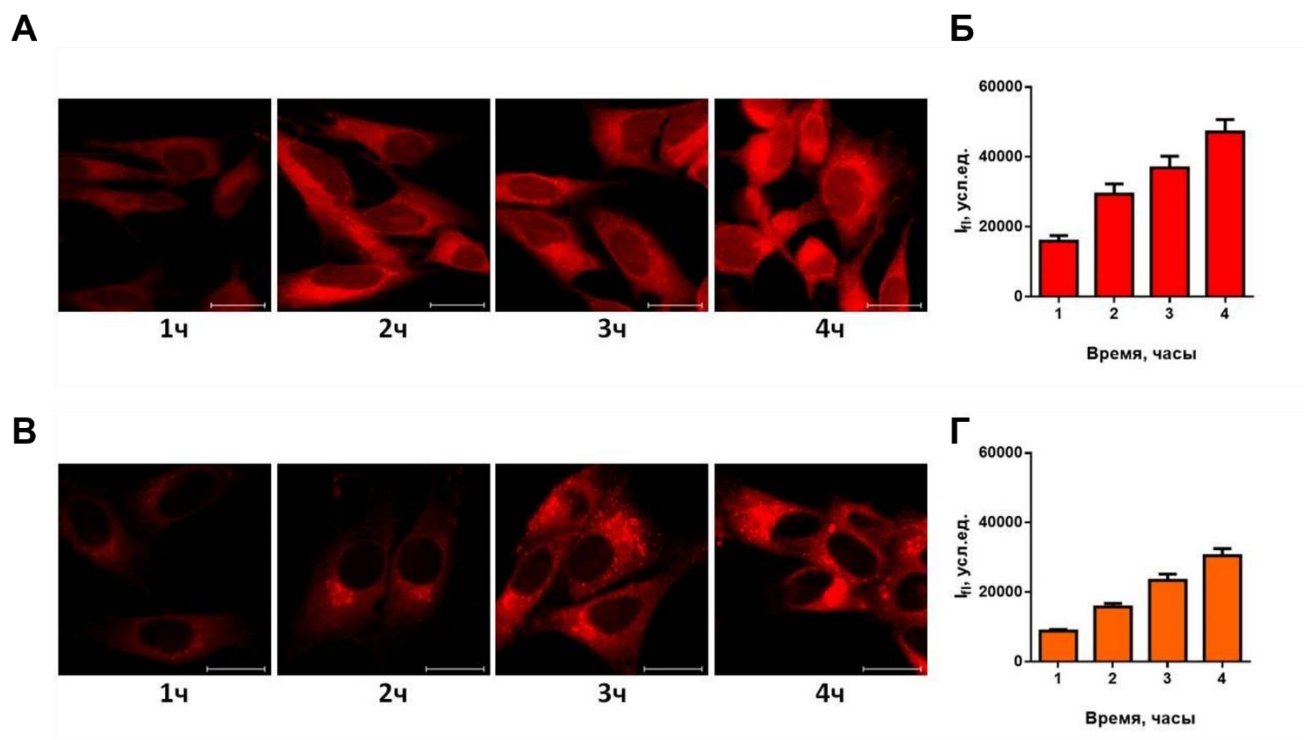


Рисунок 11. Конфокальные изображения клеток глиомы GL261 и интенсивность флуоресценции клеток после инкубации в течение 1-4 ч с порфиразином I (А) и III (В) (10 мкМ). Размер масштабной линейки 20 мкм. Значения интенсивности флуоресценции (I_f) до добавления фотосенсибилизаторов не превышали 300 усл.ед. (Б, Г) Планки погрешностей представлены стандартным отклонением ($n \geq 10$)

В случае фотосенса и фотодитазина фон, создаваемый вследствие присутствия красителя в среде, существенно ограничивает возможности микроскопического исследования клеток. Это обусловило применение смены среды после инкубации клеток перед получением их изображения и оценкой уровня флуоресцентного сигнала. Среди данных красителей наименьшая скорость показана для фотосенса, наиболее гидрофильного соединения из всех исследуемых.

Отметим, что для всех красителей инкубация продолжительностью 4 часа была достаточной для накопления значимого количества фотосенсибилизатора в клетках глиомы мыши GL261. В связи с этим, данное время инкубации было

выбрано для последующих экспериментов по анализу фотодинамической активности.

Клетки фибросаркомы мыши характеризуются высокой метаболической активностью. Фибросаркома является производной мезенхимальной фиброзной соединительной ткани, это редкая, но агрессивная саркома мягких тканей, характеризующаяся частыми рецидивами. Коммерческая линия получена из индуцированной 3-methylcholanthrene фибросаркомы у мышей C57BL/6. Опухоли сохранялись *in vivo* путем серийной подкожной трансплантации сингенным мышам и одноклеточные суспензии получали из солидных опухолей ферментативным расщеплением. Из этих клеток была создана линия клеток MCA205, которая поддерживалась *in vitro*. MCA205 одна из часто используемых линий для исследования иммуногенности различных видов терапии рака (Barth et al., 1990; Ghiringhelli et al., 2009; Sukkurwala et al., 2014; Michaud et al., 2014).

Поступление фотосенсибилизаторов в клетки MCA205 показало, что все фотоагенты одинаково быстро поступают во внутриклеточную среду при инкубации *in vitro*.

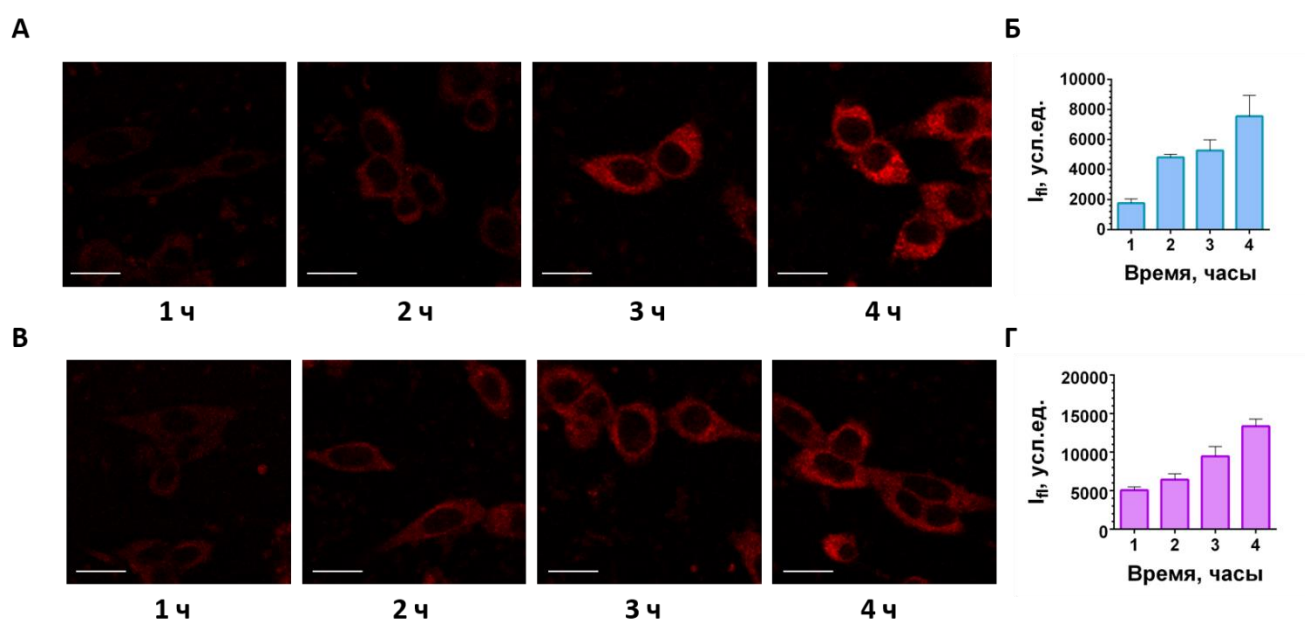


Рисунок 12. Конфокальные изображения клеток фибросаркомы MCA205 и интенсивность флуоресценции клеток после инкубации в течение 1-4 ч с фотосенсом (А, Б) и фотодитазином (В, Г) (10 мкМ). Размер масштабной линейки

20 мкм. Значения интенсивности флуоресценции (IfI) до добавления фотосенсибилизаторов не превышали 300 усл.ед. Планки погрешностей представлены стандартным отклонением ($n \geq 10$)

Быстрое увеличение фотодитазина в клетках фибросаркомы зафиксировано в течение 2х первых часов, когда как фотосенс накапливался постепенно, что было подтверждено и на клетках глиомы GL261 (рис. 12). Фотосенс преимущественно захватывается активно эндоцитозом, что характерно для фталоцианинов в комплексе с алюминием (Peng et al., 1991). 4 отрицательно заряженных сульфогрупп делают его наиболее гидрофильным представителем своего класса (Лукьянец, 2013).

Для порфиразинов характерно «разгорание» клеток на 3-4 час инкубации (рис. 13).

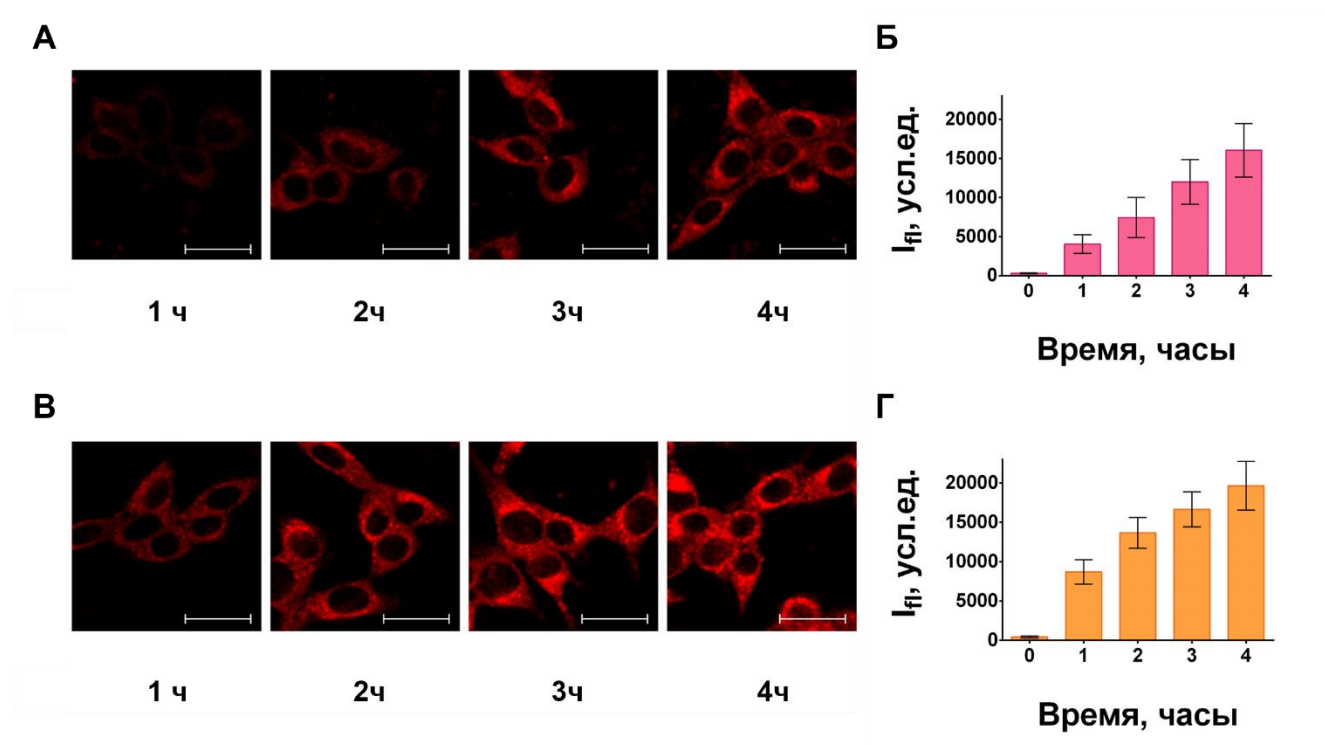


Рисунок 13. Конфокальные изображения клеток фибросаркомы MSA205 и интенсивность флуоресценции клеток после инкубации в течение 1-4 ч с порфиразином I (А) и порфиразином III (В) (10 мкМ). Размер масштабной линейки 20 мкм. Значения интенсивности флуоресценции (IfI) до добавления фотосенсибилизаторов не превышали 300 усл.ед. (Б, Г) Планки погрешностей представлены стандартным отклонением ($n \geq 10$)

Гидрофобные тетраарилтетрацианопорфиразины могут задерживаться в плазматической мембране, постепенно проникая в компартменты клетки, а именно перераспределяясь при помощи амфифильных белков цитозоля (Uzdensky et al., 2001).

2. Оценка локализации фотосенсибилизаторов в компартментах клетки

Для формирования представления о клеточном и молекулярном механизме действия фотосенсибилизаторов проведена оценка локализации фотоагентов в клеточных структурах. Результаты анализа колокализации сигнала их флуоресценции с сигналом красителей, специфически окрашивающих различные клеточные органеллы, представлены на рисунках 12-18.

Таблица 1. Данные по локализации фотосенсибилизаторов и типу клеточной смерти, вызываемой ими вследствие фотодинамического воздействия

фотосенсибилизатор	клеточная линия	накопление в органеллах	тип клеточной смерти
фотосенс	GL261	лизосомы	апоптоз, ферроптоз
	MCA205	лизосомы	
фотодитазин	GL261	аппарат Гольджи, ЭПР	апоптоз
	MCA205	аппарат Гольджи	
порфиразин I	GL261	аппарат Гольджи, ЭПР	апоптоз
	MCA205	аппарат Гольджи, лизосомы	апоптоз
порфиразин III	GL261	аппарат Гольджи	апоптоз, ферроптоз
	MCA205	ЭПР, лизосомы	апоптоз, некроптоз

Основным местом локализации фотосенса являются лизосомы и, потенциально, везикулы с другими функциями. В таких органеллах как митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ЭПР), аппарат Гольджи и ядра клеток его присутствие практически не зарегистрировано (рис. 14). Такая локализация характерна для гидрофильных фталоцианинов и объясняется лизосомотропным эффектом (Berg and Moan., 1997; Dietze et al., 2006, Лукьянец, 2013). Вероятно, фотосенс захватывается эндоцитозом, и фотосенсибилизатор сразу размещается в лизосомальных структурах без перераспределения (Узденский, 2010).

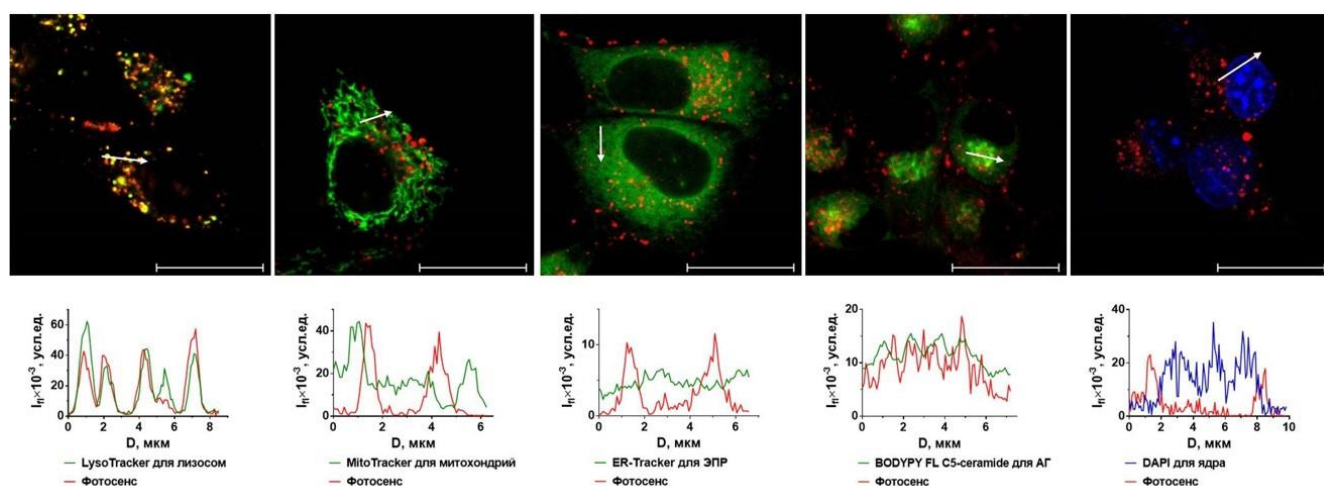


Рисунок 14. (А) Внутриклеточная локализация фотосенса в клетках глиомы GL261. Органеллы окрашены специфическими красителями. (Б) Профили флуоресцентного сигнала вдоль отрезков, указанных белой стрелкой на изображениях с наложением каналов флуоресценции. Размер масштабной линейки 20 мкм. Ifl – интенсивность флуоресценции; D – дистанция вдоль указанного отрезка

Амфифильная природа фотодитазина позволяет ему легко встраиваться в мембраны околоядерных органелл, а цианопорфиразины, как и другие гидрофобные фотосенсибилизаторы, локализуются преимущественно в перинуклеарной области, богатой цистернами ЭПР, многочисленными везикулами, сетью Аппарата Гольджи (Boyle and Dolphin, 1996; Uzdenky et al., 2001; Peng et al., 2005). В работе показано, что фотодитазин накапливается в аппарате Гольджи и ЭПР в клетках глиомы GL261, как и порфиразин I (рис. 15 и рис. 16).

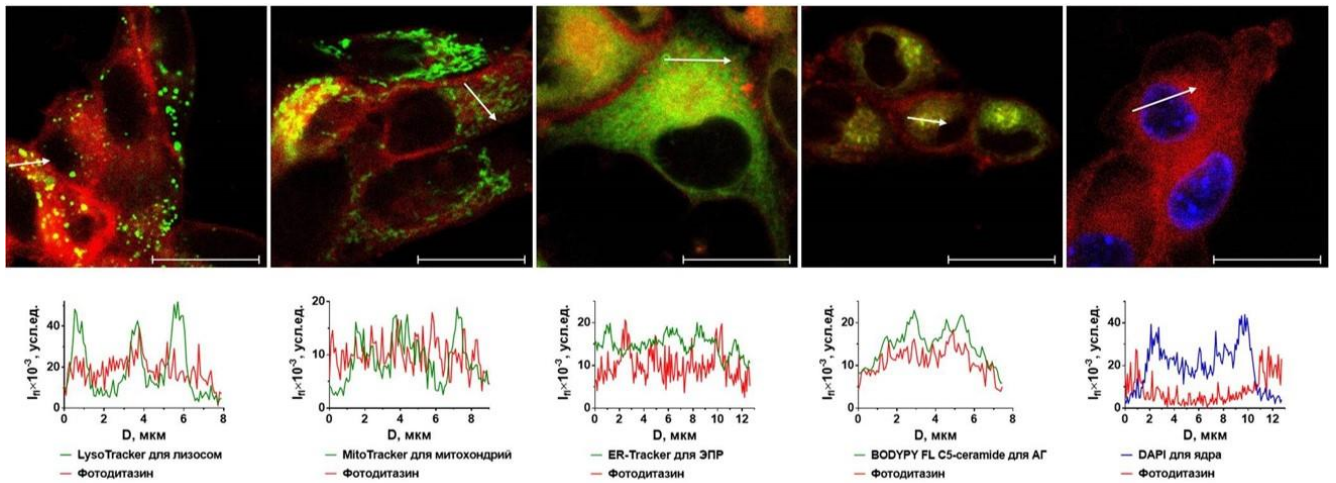


Рисунок 15. (А) Внутриклеточная локализация фотодитазина в клетках глиомы GL261. Органеллы окрашены специфическими красителями. (Б) Профили флуоресцентного сигнала вдоль отрезков, указанных белой стрелкой на изображениях с наложением каналов флуоресценции. Размер масштабной линейки 20 мкм. Ifl – интенсивность флуоресценции; D – дистанция вдоль указанного отрезка

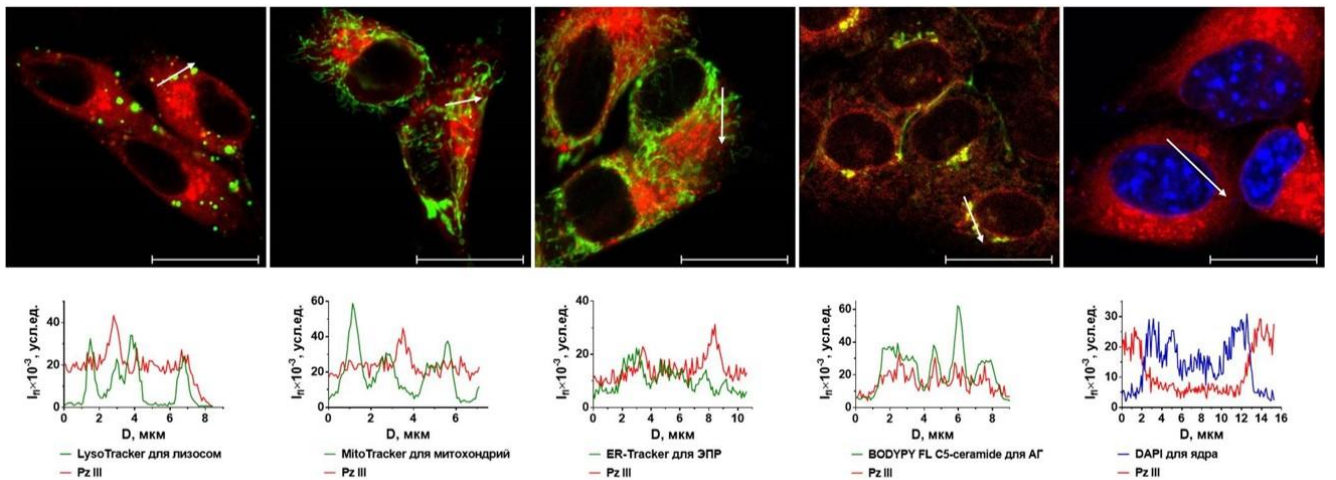


Рисунок 16. (А) Внутриклеточная локализация порфирина I в клетках глиомы GL261. Органеллы окрашены специфическими красителями. (Б) Профили флуоресцентного сигнала вдоль отрезков, указанных белой стрелкой на изображениях с наложением каналов флуоресценции. Размер масштабной линейки 20 мкм. Ifl – интенсивность флуоресценции; D – дистанция вдоль указанного отрезка

Порфиразин III преимущественно накапливается в аппарате Гольджи клеток глиомы мыши GL261 (рис. 17). При этом в клетках фибросаркомы MCA205 порфиразин III перераспределяется в ЭПР и лизосомы окооядерной области (рис.

18). Для порфиразиновых соединений внутриклеточная локализация детально ранее не исследовалась. Но гидрофобные красители с симметричной геометрией легко проникают в липидную фазу мембран и белковыми переносчиками «перегружаются» в липидные мембраны, обладающие большим сродством к гидрофобным веществам (Uzdensky et al., 2001).

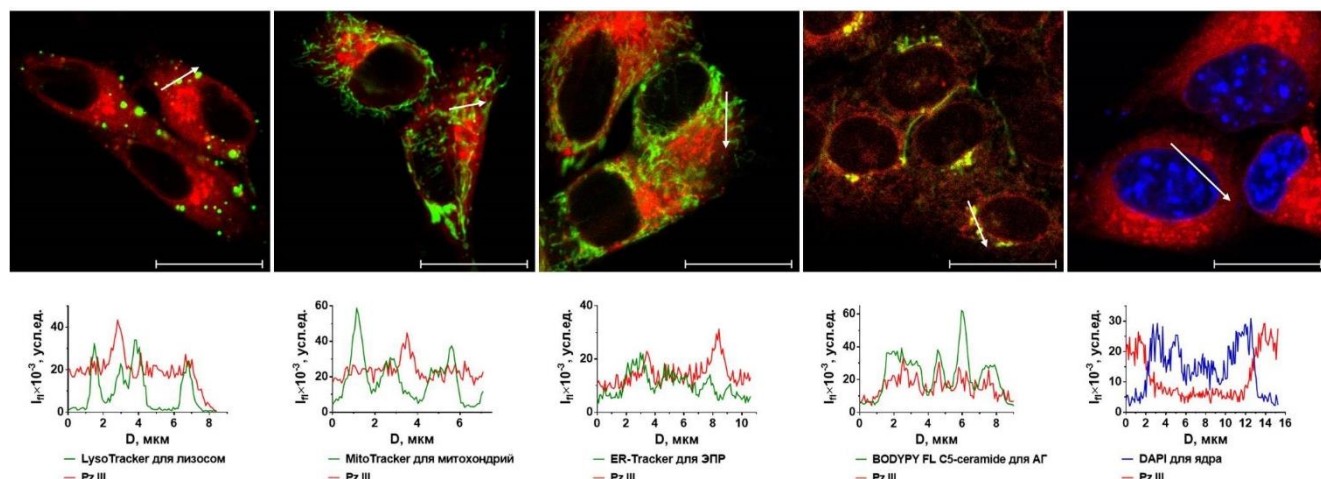


Рисунок 17. (А) Внутриклеточная локализация порфиразина III в клетках глиомы GL261. Органеллы окрашены специфическими красителями. (Б) Профили флуоресцентного сигнала вдоль отрезков, указанных белой стрелкой на изображениях с наложением каналов флуоресценции. Размер масштабной линейки 20 мкм. I_f – интенсивность флуоресценции; D – дистанция вдоль указанного отрезка

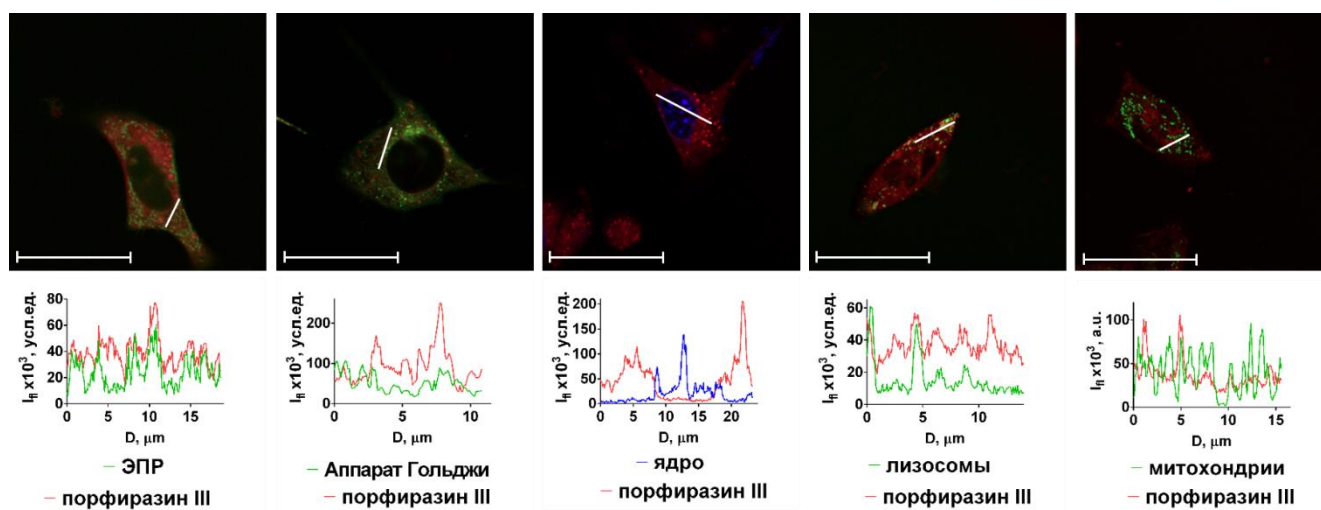


Рисунок 18. (А) Внутриклеточная локализация порфиразина III в клетках фибросаркомы МСА205. Органеллы окрашены специфическими красителями. (Б)

Профили флуоресцентного сигнала вдоль отрезков, указанных белой стрелкой на изображениях с наложением каналов флуоресценции. Размер масштабной линейки 20 мкм. Ifl – интенсивность флуоресценции; D – дистанция вдоль указанного отрезка

Ранее не было охарактеризовано накопление порфиразинов в компартментах клетки, поэтому анализ также был проведен на клеточной линии фибросаркомы мыши. Порфиразин I в клетках фибросаркомы накапливался в аппарате Гольджи и лизосомах (рис. 19).

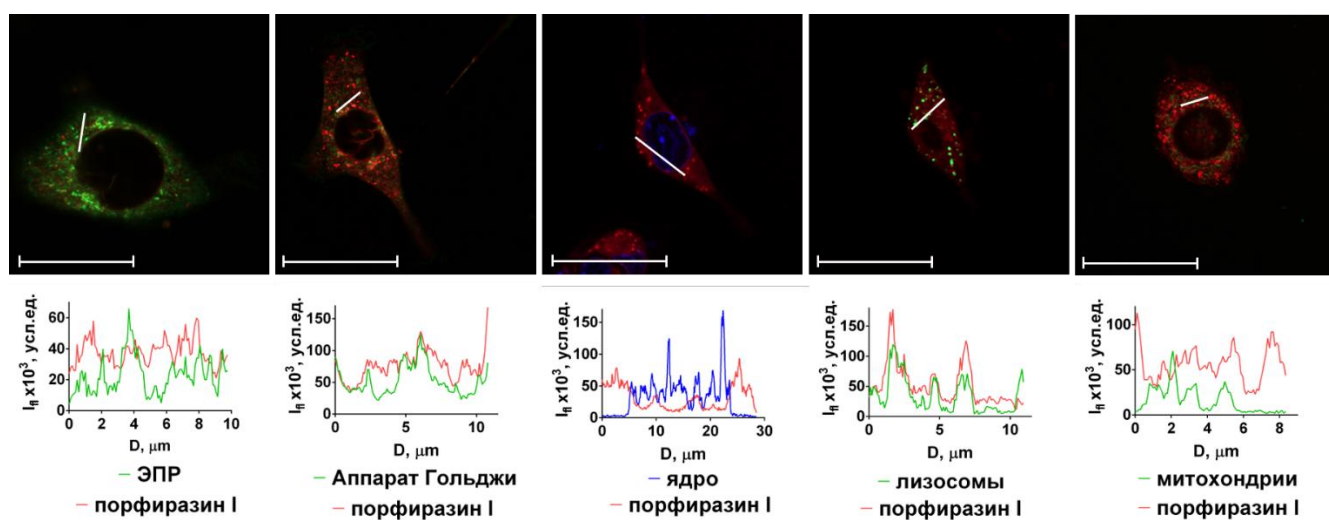


Рисунок 19. (А) Внутриклеточная локализация порфиразина I в клетках фибросаркомы MCA205. Органеллы окрашены специфическими красителями. (Б) Профили флуоресцентного сигнала вдоль отрезков, указанных белой стрелкой на изображениях с наложением каналов флуоресценции. Размер масштабной линейки 20 мкм. Ifl – интенсивность флуоресценции; D – дистанция вдоль указанного отрезка

Фотосенс преимущественно накапливается в лизосомах в клетках фибросаркомы MCA205, а фотодитазин локализуется только в аппарате Гольджи (рис. 20)

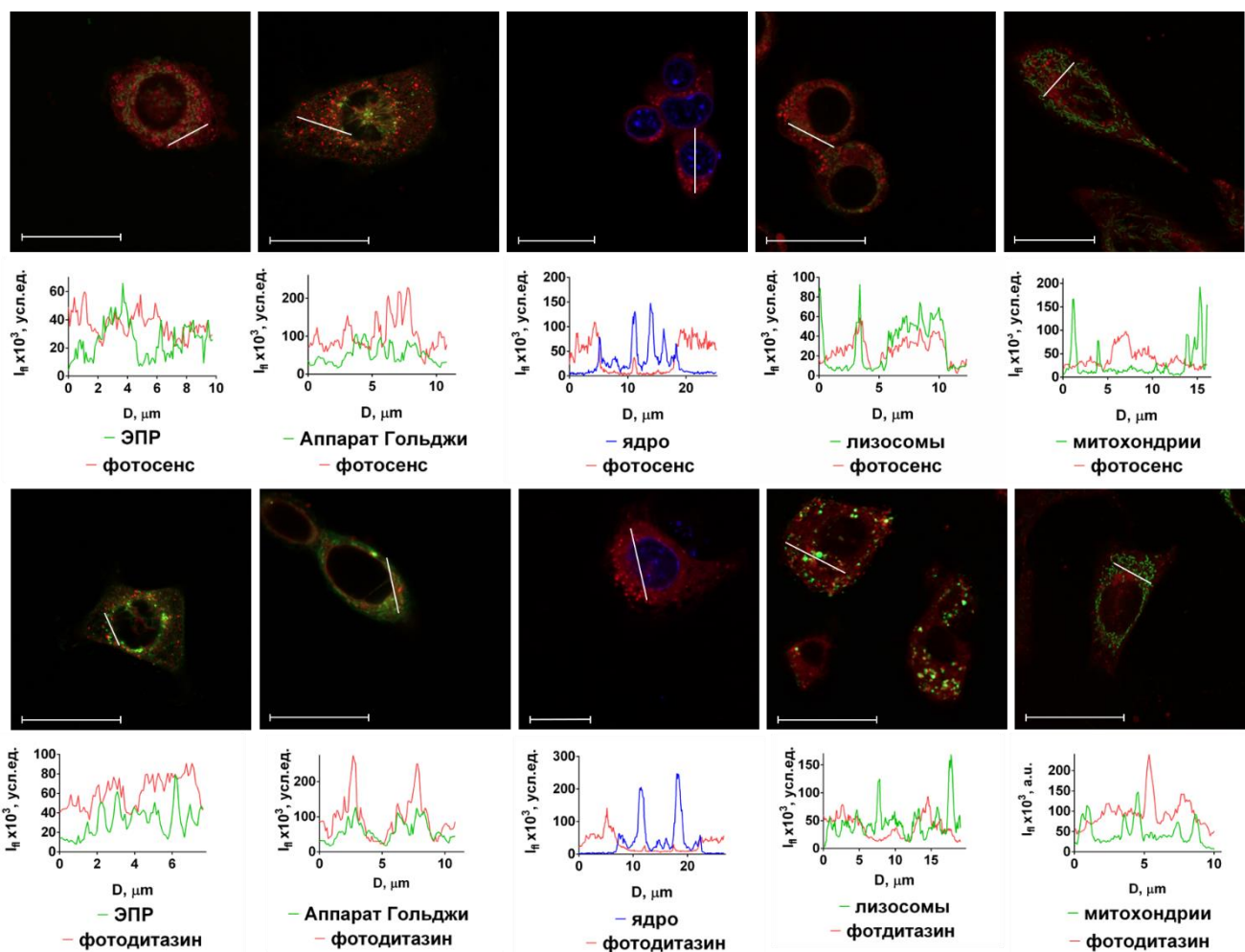


Рисунок 20. (А, В) Внутриклеточная локализация фотосенса и фотодитазина в клетках фибросаркомы МСА205. Органеллы окрашены специфическими красителями. (Б, Г) Профили флуоресцентного сигнала вдоль отрезков, указанных белой стрелкой на изображениях с наложением каналов флуоресценции. Размер масштабной линейки 20 мкм. Ifl – интенсивность флуоресценции; D – дистанция вдоль указанного отрезка

Локализация фотосенсибилизатора является одним из ключевых факторов, определяющих первичные мишени при облучении и весь ход последующего развития событий, включая молекулярные механизмы ответа, и характеризует тип гибели клетки и ее иммуногенность (Buytaert et al., 2007; Agostinis et al., 2011; Krysko et al., 2012; Alzeibak et al., 2021). Так как $^1\text{O}_2$ может повреждать только структуры, находящиеся в непосредственной близости от фотосенсибилизатора, поэтому механизмы цитотоксичности определяются внутриклеточной локализацией красителя (Moan and Berg, 1991, Uzdensky et al., 2001).

3. Индукция клеточной смерти

Условия клеточной гибели для линий опухолевых клеток глиомы GL261 и фибросаркомы МСА205 подбирались для двух вариантов культурального пластика и были повторены для всех экспериментов.

Для ингибиторного анализа использовались 96-луночные культуральные плоскодонные планшеты с адгезивным покрытием. Клетки глиомы линии GL261 высевались в количестве $6 \cdot 10^3$ клеток на лунку, МСА205 - $5 \cdot 10^3$ клеток. Для ингибиторного анализа использовались концентрации фотосенсибилизаторов, приводящие к гибели 50% клеток (IC50). Для клеточной линии GL261 показано, что концентрация фотосенса $0,96 \cdot 10^{-6}$ М приводит к гибели $47,67 \pm 7,3\%$ клеток в то время, как концентрация $0,8 \cdot 10^{-6}$ М ведет к смерти $52,33 \pm 6,7\%$ клеток.

На клеточной линии МСА205 IC50 фотосенса составляет $1,45 \cdot 10^{-6}$ М, при этом $42,95 \pm 9,1\%$ клеток подвергаются клеточной смерти. Концентрация фотосенса $1,21 \cdot 10^{-6}$ М приводила в экспериментах к $43,95 \pm 8,2\%$ клеточной гибели (рис. 21).

Для порфиразинов также проведены анализы цитотоксичности (рис. 22).

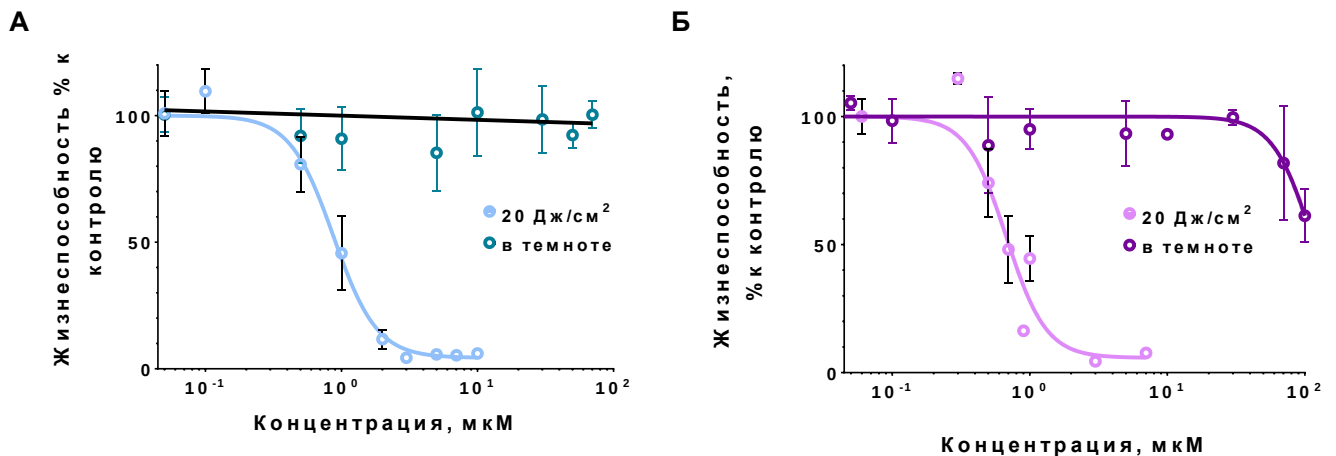


Рисунок 21. Эффективность индукции клеточной смерти на культуре клеток фибросаркомы МСА205 в зависимости от концентрации фотосенсибилизаторов фотосенс (А) и фотодитазин (Б) в темноте (контроль) и при облучении в дозе 20 Дж/см². Показаны типичные зависимости из 3-5 независимых экспериментов. Планки погрешностей представлены стандартным отклонением (число повторов в одном эксперименте n=3)

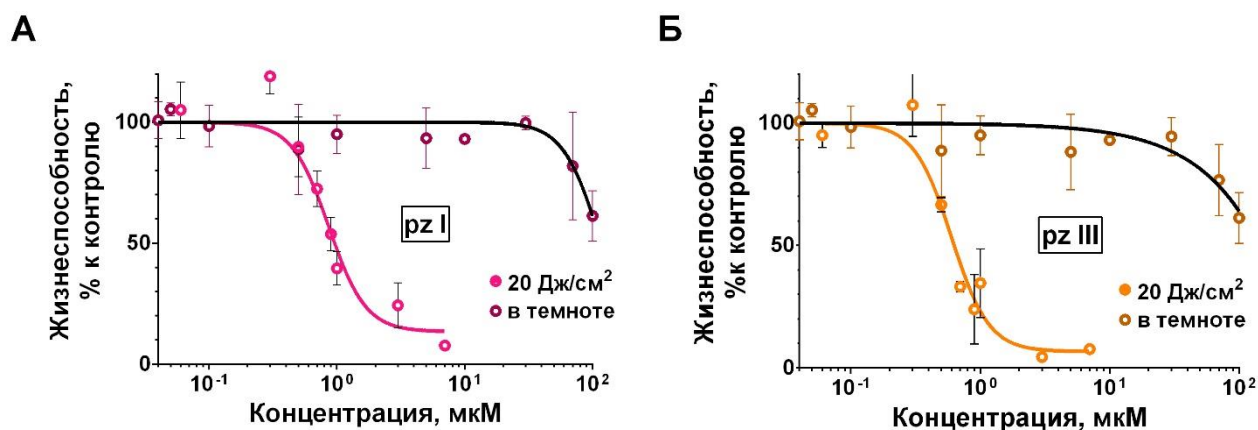


Рисунок 22. Эффективность индукции клеточной смерти на культуре клеток фибросаркомы MCA205 в зависимости от концентрации фотосенсибилизаторов порфиразин I (А) и порфиразин III (Б) в темноте и при облучении в дозе 20 Дж/см². Показаны типичные зависимости из 3-5 независимых экспериментов. Планки погрешностей представлены стандартным отклонением (число повторов в одном эксперименте n=3)

Для анализа высвобождения DAMPs и определения фенотипического статуса дендритных клеток после сокультивирования с фотоиндуцированными клетками опухолевые линии глиомы GL261 и MCA205 были индуцированы на чашках Петри диаметром 60 мм.

Клетки высевались в количестве $3 \cdot 10^5$ клеток на чашку и индуцировались концентрацией фотосенсибилизатора, при которой 85% клеток подвергаются клеточной гибели. Фотосенс использовался в концентрации $1,2 \cdot 10^{-6}$ М для клеток глиомы GL261 и $1,5 \cdot 10^{-6}$ М для клеток фибросаркомы MCA205. Фотодитазин - $1,4 \cdot 10^{-6}$ М и $1,8 \cdot 10^{-6}$ М – для глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205 соответственно. Порфиразин I использовался в концентрации $2,4 \cdot 10^{-6}$ М на клеточной линии глиомы GL261, и $2,8 \cdot 10^{-6}$ М на фибросаркоме мыши MCA205. Для порфиразина III эти концентрации составили $1,8 \cdot 10^{-6}$ М и $2,4 \cdot 10^{-6}$ М.

4. Цитофлуорометрическая оценка процента клеточной гибели фотоиндуцированных клеток

В анализе окраска Annexin V и Sytox Blue использовалась для идентификации популяций клеток, подвергшимся разным стадиям клеточной смерти. Annexin V используется в качестве неколичественного зонда для обнаружения клеток, которые экспрессируют фосфатидилсерин (ФС) на поверхности клетки: событие, обнаруживаемое при апоптозе, а также других формах гибели клеток (Krysko et al., 2004; Krysko et al., 2008; Wlodkowic et al., 2011; Li et al., 2015; Gong et al., 2017). Самая большая популяция - Annexin V⁺/Sytox Blue⁺ - целевая популяция, вносящая самый большой вклад в иммуногенность, это клетки с пермеабиллизированной мембраной на поздней стадии клеточной смерти. Annexin V⁺/Sytox Blue⁻ популяция представляет собой клетки на ранней стадии регулируемой клеточной гибели с фосфатидилсерином на внешней мембране без нарушения целостности. Annexin V⁻/Sytox Blue⁺ - клетки, погибающие неконтролируемо в процессе пробоподготовки от физических факторов во время манипуляций, цитоплазматическая мембрана повреждена или разрушена (Wlodkowic et al., 2011).

По результатам цитофлуорометрического анализа $75,09 \pm 0,82\%$ клеток глиомы мыши GL261 (рис. 23 А) погибали вследствие фотодинамической индукции с использованием фотосенса в течение 24 часов при концентрации фотосенсибилизатора IC85. В идентичных условиях процент гибели клеток, индуцированных фотодитазином, составил $93,0 \pm 14,77\%$. Процент клеточной смерти при индукции порфиразином I и порфиразином III составил $78,66 \pm 7,22\%$ и $87,86 \pm 11,35\%$ соответственно.

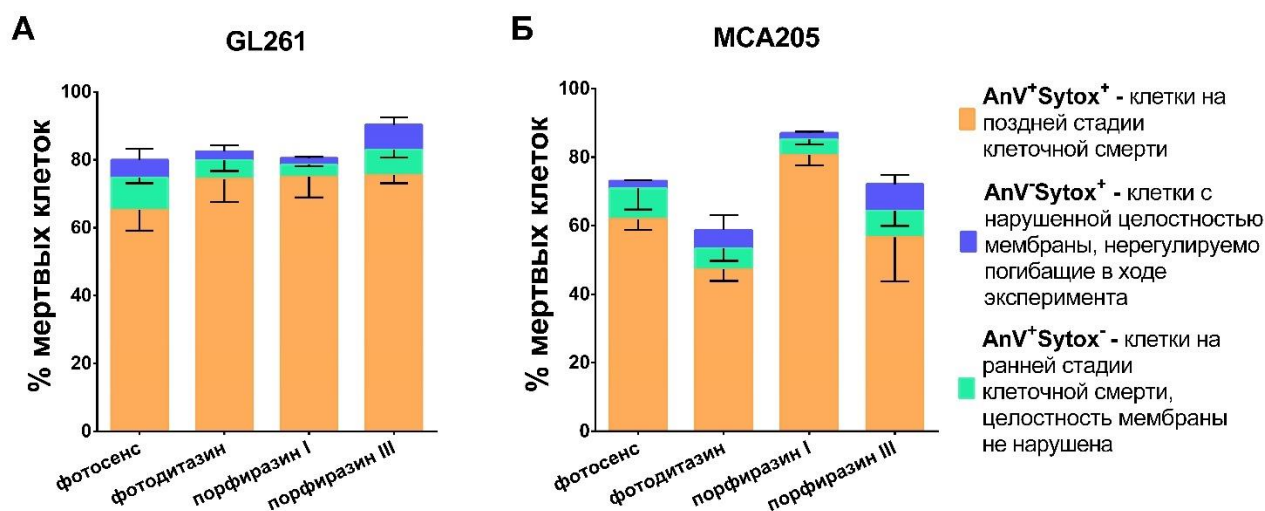


Рисунок 23. Процент мертвых клеток от общей популяции при окраске Annexin V и Sytox Blue, детекция цитофлуорометрией (FACS Canto). Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего семи независимых экспериментов на клетках глиомы мыши GL261 (А) и фибросаркомы мыши MCA205 (Б). $n \geq 7$

Действие фотосенсибилизаторов на клеточную линию фибросаркомы мыши MCA205 при использовании выбранных фотосенсибилизаторов было следующим: применение фотосенса и фотодитазина приводило к $73,10 \pm 4,66\%$ и $64,33 \pm 11,80\%$ клеточной гибели. При использовании концентрации IC85 порфиразин I через 24 часа индуцировал гибель $84,96 \pm 2,05\%$ клеток фибросаркомы MCA205. Использование порфиразина III приводило к $69,53 \pm 33,59\%$ гибели клеточной популяции (рис. 23 Б).

5. Ингибиторный анализ для определения типа клеточной гибели при ФДТ

Фотодинамическая терапия может индуцировать как некроз, так и регулируемые формы клеточной смерти в зависимости от того, какие структуры повреждаются в первую очередь (Узденский, 2010). Из фотоповрежденных цистерн ЭПР и аппарата Гольджи высвобождаются ионы Ca^{2+} , белки Bid и Bap31, каспаза 12 и другие стрессовые сигналы. По не которым данным (Matroule et al., 2001)

фотодинамическое повреждение аппарата Гольджи играет важную роль в индукции апоптоза, опосредованного активацией каспазы 2. При фотосенсибилизации клеток A431 гиперичином, который также локализуется в комплексе Гольджи, отмечалась значительная активация каспазы 2, каспазы 3, каспазы 6 и каспазы 9 (Berlanda et al., 2006).

Фотоагенты, локализующиеся преимущественно в лизосомах, могут вызывать клеточную гибель с комбинацией свойств некроза (или частного случая – некроптоза) и апоптоза (Kessel et al., 2000; Miki et al., 2015). Фотоповреждение лизосом ведет к испусканию из них катепсинов, под действием которых прокаспаза 3 переходит в активную форму – каспазу 3. Помимо этого катепсины активируют проапоптотический белок Bid, который способствует олигомеризации Bak на мембране митохондрий. Вследствие этого из митохондрий испускается цитохром c и другие проапоптотические белки (Kessel et al., 2000; Caruso et al., 2004; Узденский, 2010, Dhuriya and Sharma, 2018).

С целью установления типа клеточной гибели, индуцируемой при фотодинамическом воздействии с фотосенсибилизаторами, был проведен анализ жизнеспособности опухолевых клеток с применением специфических ингибиторов клеточной смерти (табл. 1). (Demuynck et al., 2020) Использованы ингибиторы, селективно блокирующие апоптоз (панкаспазный ингибитор zVAD-fmk), некроптоз (ингибитор киназы RIP1 некростатин-1s) или ферроптоз (ловушка липидных радикалов ферростатин-1 и DFO – хелатор железа). Как предполагается, механизм гибели клеток может зависеть как от природы фотосенсибилизатора, так и от его концентрации, а также дозы облучения, локализации в компартментах клетки, плотности культивирования клеток, количества связей между ними и т.д. Если при очень интенсивных воздействиях, приводящих к практически полной гибели всех клеток культуры, стоит ожидать нерегулируемой смерти (нерегулируемый некроз, англ. accidental necrotic cell death), то при более слабых воздействиях может существенно возрасти вклад различных видов регулируемой клеточной смерти.

Оптимальным временем инкубации после индукции определено 13 часов. Через 13 часов после фотодинамического воздействия эффект ингибиторов ферроптоза и апоптоза был значительно более выражен. Панкаспазный ингибитор zVAD-fmk существенно повышал жизнеспособность культуры глиомы GL261 при действии и фотосенса, и фотодитазина. Помимо этого, влияние ингибитора ферроптоза, дефероксамина (DFO), также выявлено для фотосенса (рис. 24; табл. 1).

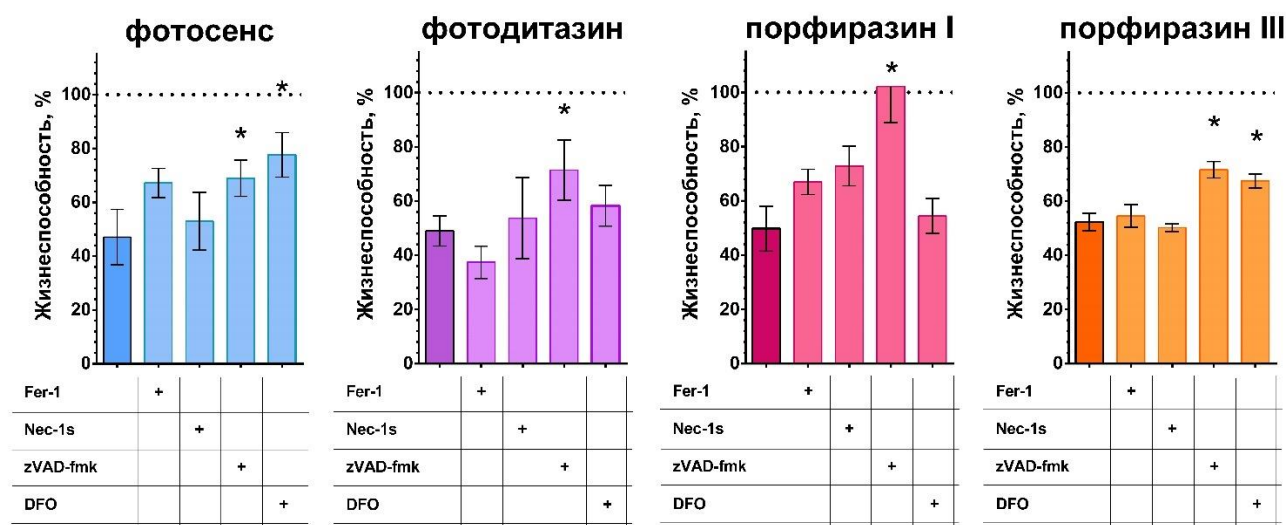


Рисунок 24. Эффективность индукции клеточной смерти на культуре клеток глиомы GL261 при обработке различными фотосенсибилизаторами в присутствии ингибиторов клеточной смерти при облучении в дозе 20 Дж/см². * – статистически значимое отличие указанных вариантов обработки, t-критерий Уэлча, $p < 0,05$

Ингибирование апоптоза повышало жизнеспособность культур, индуцированных порфиразином I, также влияние этого ингибитора показано для клеток глиомы, индуцированных порфиразином III. Добавление в культуры хелатора железа достоверно повышало жизнеспособность клеток, индуцированных порфиразином III, что говорит о ферроптотической природе клеточной смерти.

Проведенный ингибиторных анализ на клеточной линии фибросаркомы мыши MCA205 подтвердил, что порфиразин I вызывает апоптоз опухолевых клеток при фотоактивации, как и порфиразин III. При использовании ингибитора

некроптоза также повышалась жизнеспособность клеточных культур при использовании порфиразина III, что согласуется с данными литературы (Kessel et al., 2000) (рис. 25, табл. 1).

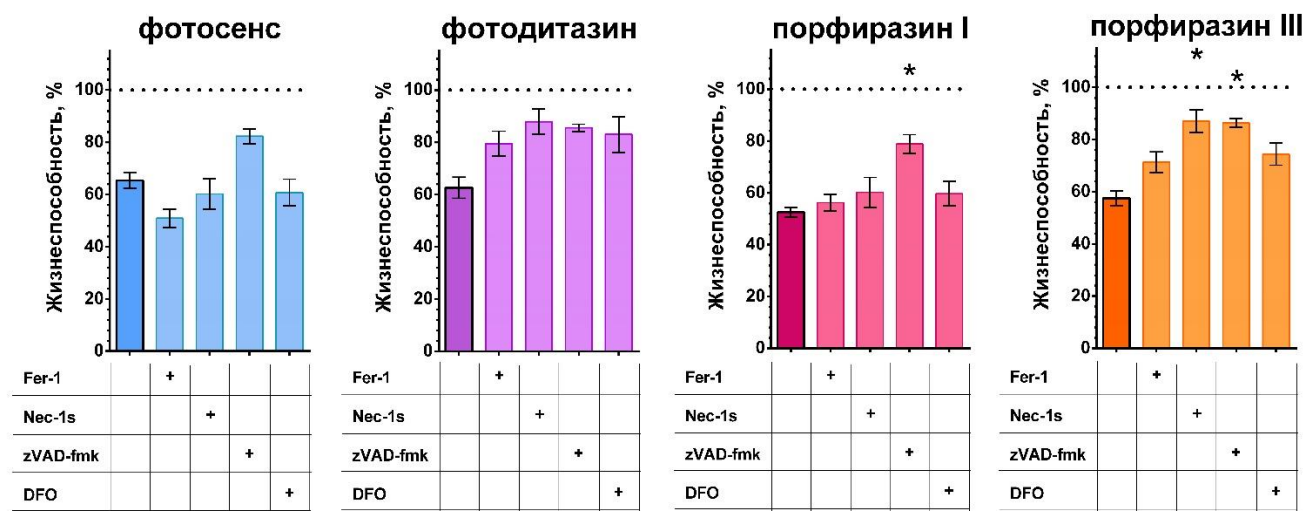


Рисунок 25. Эффективность индукции клеточной смерти на культуре клеток глиомы МСА205 при обработке различными фотосенсибилизаторами в присутствии ингибиторов клеточной смерти при облучении в дозе 20 Дж/см². * – статистически значимое отличие указанных вариантов обработки, t-критерий Уэлча, $p < 0,05$

Для фотосенса и фотодитазина не было показано достоверных отличий в выживаемости клеток фибросаркомы МСА205 относительно контрольной группы. В продолжении работы следует увеличить количество биологических повторов для выявления ингибирования отдельных путей клеточной смерти.

В целом можно отметить, что ответы клеток на фотодинамическое воздействие с исследуемыми соединениями различны, что подтверждает предположение, согласно которому тип индуцируемой клеточной гибели может различаться в зависимости от физико-химических свойств фотодинамического агента и его локализации в клетке.

6. Анализ высвобождения HMGB1 умирающими клетками

HMGB1 является одним из ядерных белков, участвующих в организации ДНК, реконструкции хроматина, а также обеспечении транскрипции ряда генов (Bianchi and Agresti, 2005). В процессе гибели клетки HMGB1 выделяется во внеклеточную среду и выступает в качестве сигнала опасности, направленного на активацию антигенпрезентирующих клеток (Krysko et al., 2013; Kepp et al., 2014; Mishchenko et al., 2019). В модели аденокаринемы толстой кишки мыши СТ26 было показано, что иммунизация погибающими опухолевыми клетками с блокированной экспрессией HMGB1 снижала противоопухолевую защиту животных при инокуляции живых клеток СТ26 (Apetoh et al., 2007). В этой работе также показано, что для уничтожения опухолевого очага при индукции иммуногенной смерти необходимо связывание HMGB1 с Toll-подобным рецептором 4 (TLR4). В микроокружении опухоли HMGB1 связывается с RAGE, что приводит к активации провоспалительных механизмов (Solari et al., 2020).

Методом иммуноферментного анализа было определено количественное содержание HMGB1 в супернатантах клеток глиомы GL261 и фибросаркомы МСА205, подверженных фотодинамическому воздействию с применением исследуемых фотосенсибилизаторов (рис. 26).

Высвобождение HMGB1 GL261

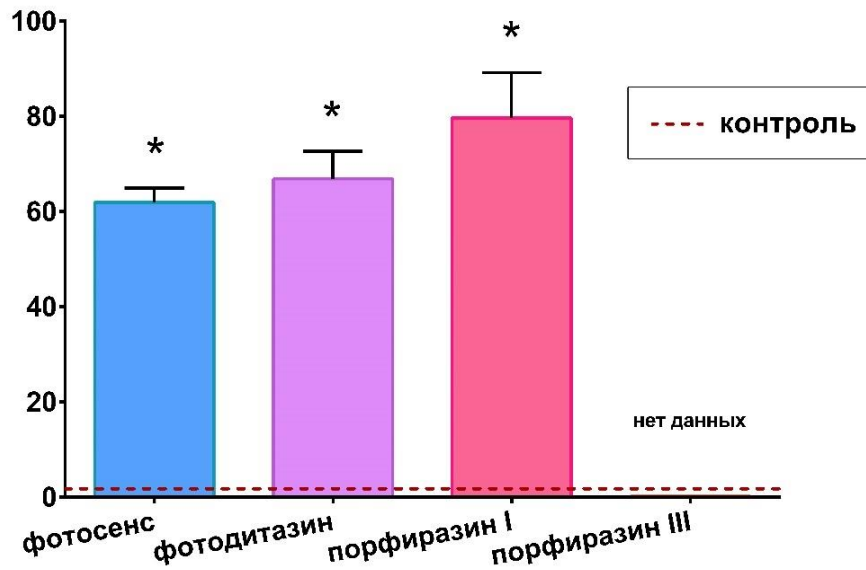


Рисунок 26. Уровень высвобожденного HMGB1 во внеклеточной среде при индукции клеток глиомы GL261 фотодинамическим воздействием с применением фотосенса и фотодитазина. HMGB1 количественно определяли в супернатантах клеток методом иммуноферментного анализа. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего четырех независимых экспериментов. * - $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни

Было показано, что в супернатантах контрольной группы (не индуцированные клетки глиомы мыши GL261) концентрация HMGB1 в среднем составила $2,88 \pm 1,69$ нг/мл. Фотодинамическое воздействие с применением исследуемых фотосенсибилизаторов приводило к достоверному 20-кратному повышению уровня свободного HMGB1. Концентрация HMGB1 в супернатантах групп «фотосенс» и «фотодитазин» составила $61,87 \pm 7,86$ нг/мл и $66,86 \pm 8,18$ нг/мл соответственно. Полученные результаты коррелируют с ранее полученными данными, согласно которым применение иммуногенного препарата митоксантрона способствует повышению выброса HMGB1 в 15-30 раз (Liu et al., 2017). Индуцированные порфиразином I GL261 высвобождали $79,68 \pm 9,48$ нг/мл HMGB1. Интересно отметить, что в отличие от экспонирования кальретикулина, уровень которого в разный период времени после фотодинамического воздействия

различался в зависимости от применяемого фотосенсибилизатора, уровень HMGB1 в культуральной среде через 24 часа был соизмерим для всех экспериментальных групп.

По сравнению с клетками глиомы GL261, для клеток постоянной клеточной линии фибросаркомы MCA205 наблюдалось более интенсивное высвобождение HMGB1 (рис. 27). Концентрация HMGB1 в группах фотоиндуцированных клеток MCA205 с применением фотосенса и фотодитазина, составила $110,57 \pm 5,88$ нг/мл и $121,27 \pm 11,79$ нг/мл, что превышало значения соответствующих групп клеток глиомы GL261 в 1.7 раз и 1.8 раз.

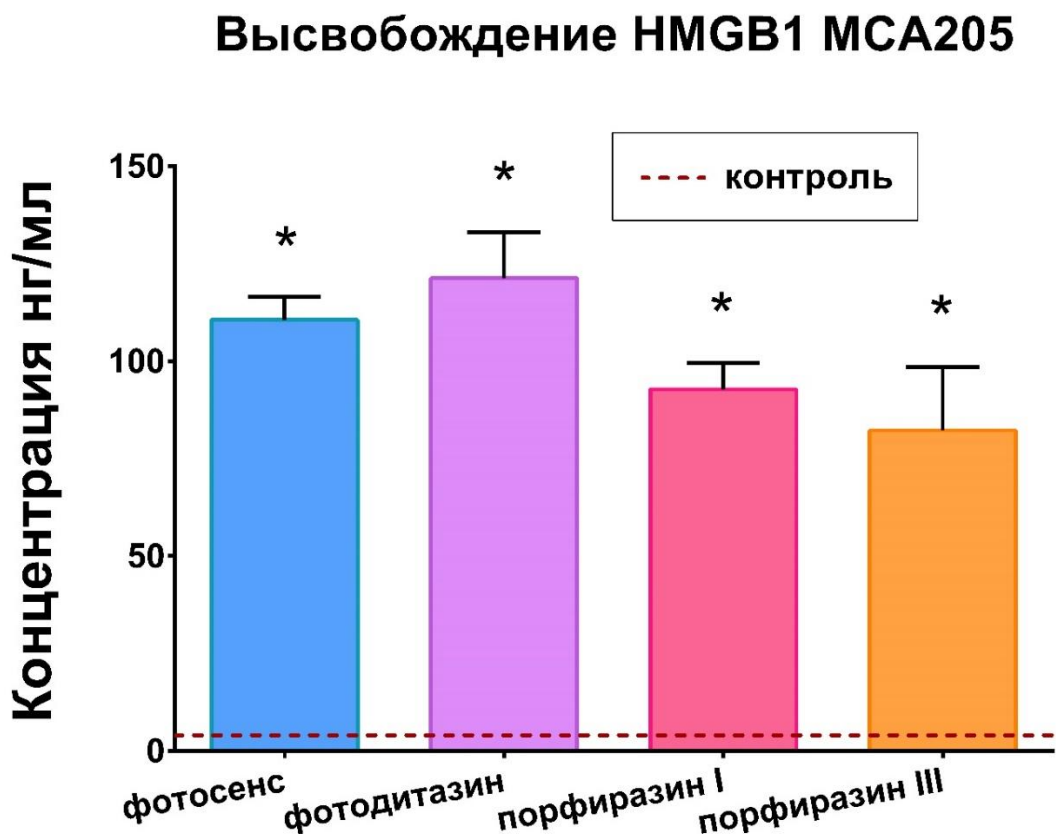


Рисунок 27. Уровень высвобожденного HMGB1 во внеклеточной среде при индукции клеток фибросаркомы MCA205 фотодинамическим воздействием с применением фотосенса и фотодитазина. HMGB1 количественно определяли в супернатантах клеток методом иммуноферментного анализа. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего четырех независимых экспериментов. * - $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни

Концентрация в супернатантах неиндуцированных клеток фибросаркомы МСА205 составила $3,13 \pm 1,51$ нг/мл, а при индукции порфиразином I концентрация выросла в 30 раз и составила $92,72 \pm 6,78$ нг/мл. Фотодинамическое воздействие с применением порфиразина III приводило к достоверному увеличению уровня свободного HMGB1 в 26 раз. Концентрация составила $82,23 \pm 16,25$ нг/мл.

7. Количественный анализ АТФ во внеклеточной среде после индукции клеточной смерти

В норме аденозинтрифосфат (АТФ) играет ведущую роль в энергетических процессах и поддержании гомеостаза. В концепции иммуногенной клеточной смерти молекулы АТФ являются сигналами «найди меня». В ответ на индукторы клеточной гибели АТФ перераспределяется из лизосом в аутолизосомы и секретируется во внеклеточную среду, где выступает в качестве сигнала для привлечения антигенпрезентирующих клеток (Krysko et al., 2013; Kepp et al., 2014). АТФ активирует рецепторы P2RX7 (пуринорецептор-P2X-7) на поверхности дендритных клеток, тем самым активируя каскад NLRP3-ASC-Casp-1, запуская протеолитическое созревание каспазы-1, расщепление про-IL-1 β , вследствие чего высвобождается IL-1 β . Этот цитокин необходим для созревания CD8⁺ Т-клеток, продуцирующих IFN- γ (Ghiringhelli et al., 2009).

Испускание АТФ GL261

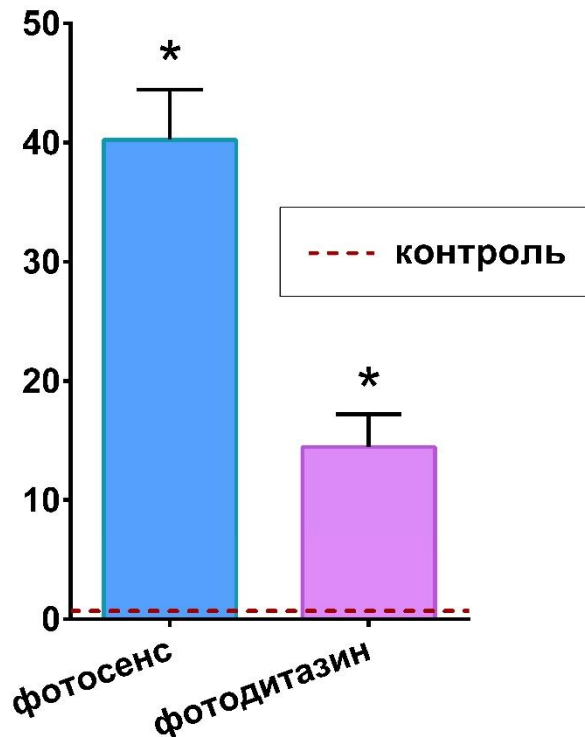


Рисунок 28. Испускание АТФ умирающими клетками глиомы GL261, подвергшимися фотодинамическому воздействию с применением фотоагентов фотосенс и фотодитазин. Значения представлены кратным увеличением АТФ по сравнению с необработанными клетками ± стандартная ошибка среднего четырех независимых экспериментов. * - $p < 0.006$, критерий Манна-Уитни

Было показано, что по сравнению с контрольной группой, клетки глиомы GL261, индуцированные фотосенсом, вызывают 40.24 ± 6.34 кратный выход АТФ. Менее выраженный эффект показан для клеток глиомы, индуцированных фотодитазин. Несмотря на то, что в данной экспериментальной группе регистрировалось 14.43 ± 3.79 кратное превышение контрольных значений, выход АТФ был в 2.5 раза ниже показателей группы «фотосенс» (рис. 28).

Схожая динамика изменений показана для клеток фибросаркомы МСА205 (рис. 29), однако разница между двумя экспериментальными группами была меньше. Уровень высвобожденного АТФ установленного

для клеток фибросаркомы МСА205, индуцированных фотосенсом, превысил значения группы «фотодитазин» только в 1.5 раза.

На клеточной линии фибросаркомы установлено значение АТФ в супернатантах клеток, индуцированных порфиразином I и III. Показано, что значения высвободившегося АТФ фотоиндуцированных порфиразином I и порфиразином III клеток в 5 и более раз превышали значения группы «фотосенс» и в 2,5 раза – значения группы «фотодитазин». Стоит предположить, что разница в значениях выхода АТФ из умирающих клеток фибросаркомы при действии ФДТ и

разных фотосенсибилизаторов может быть связана с разным механизмом гибели клеток.

Испускание АТФ МСА205

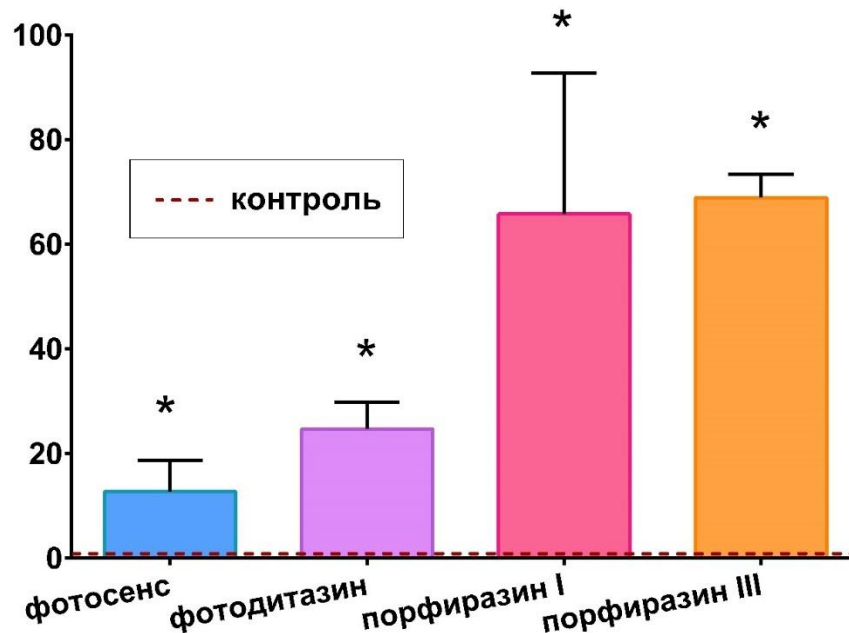


Рисунок 29. Испускание АТФ умирающими клетками фибросаркомы МСА205, подвергшимися фотодинамическому воздействию с применением фотоагентов фотосенс и фотодитазин. Значения представлены кратным увеличением АТФ по сравнению с необработанными клетками $\pm$ стандартная ошибка среднего четырех независимых экспериментов. * - $p < 0.006$, критерий Манна-Уитни

8. Анализ экспонирования кальретикулина на поверхности фотодинамически индуцированных клеток

Согласно опубликованным данным, кальретикулин является одним из ранних маркеров иммуногенной клеточной гибели (Krysko et al., 2003; Obeid et al., 2007; Martins et al., 2014). В норме, являясь Ca^{2+} -связывающим белком эндоплазматического ретикулума (ЭПР), кальретикулин принимает активное участие в поддержании концентрации ионов Ca^{2+} в клетке. Появление кальретикулина на поверхности мембраны происходит в первые часы после повреждающего воздействия. Это является одним из первых признаков гибели

клетки, предшествующих морфологическим изменениям, связанным с активацией апоптотических процессов, и способствует презентации опухолевого антигена и опухолевоспецифичным ответам цитотоксических Т-лимфоцитов (Krysko et al., 2013; Kerr et al., 2014). Кальретикулин способствует распознаванию умирающих клеток фагоцитами, экспрессирующими маркер CD91. Связывание эктокальретикулина с CD91 облегчает захват опухолевых антигенов дендритными клетками, способствуя кросс-презентации и активации цитотоксических CD8⁺-Т-лимфоцитов (Liu et al., 2019).

Была проведена количественная оценка уровня экспонирования кальретикулина на поверхности клеток глиомы GL261, подверженных фотодинамическому воздействию с использованием фотосенса и фотодитазина. В качестве положительного контроля применяли препарат митоксантрон (2мкМ), для которого ранее была установлена способность к запуску механизмов иммуногенной клеточной смерти (Garg et al., 2012). В результате проведенного анализа был зарегистрирован активный выброс кальретикулина клетками глиомы GL261, подверженных ФДТ с применением фотосенса и фотодитазина (рис. 30).

Экспонирование кальретикулина (CRT) на клетках глиомы GL261

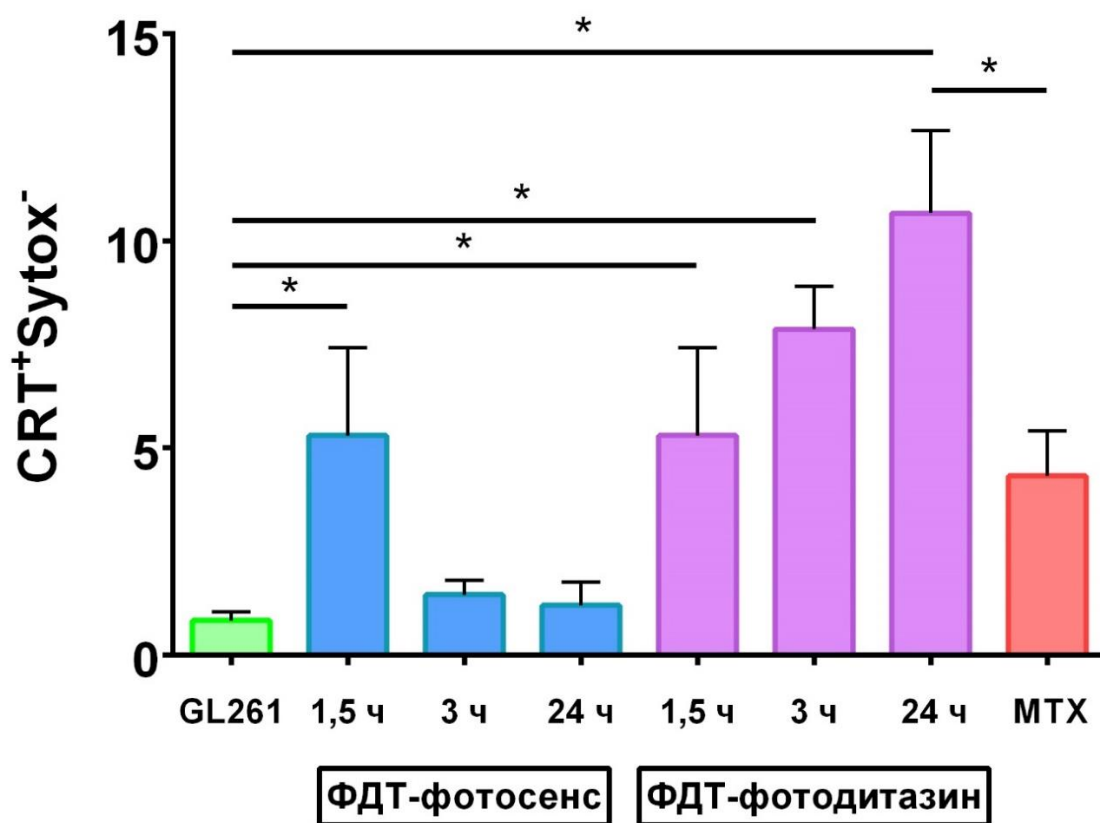


Рисунок 30. Экспонирование кальретикулина на поверхности мембраны клеток глиомы GL261, индуцированных фотодинамической терапией с применением фотосенса и фотодитазина. МТХ – положительный контроль, клетки, индуцированные митоксантроном. Процент кальретикулин-положительных живых клеток оценивали методом проточной цитометрии. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего трех независимых экспериментов (каждый эксперимент проводился в двух технических повторах). * - $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни

Уровень определяли иммуноокрашиванием клеток антителами к кальретикулину (0.5 мг/мл; rabbit, ab210431) в сравнении с изотип-контролем IgG (0,5 мг/мл, rabbit, ab208150) для отсеки неспецифического сигнала (рис. 31).

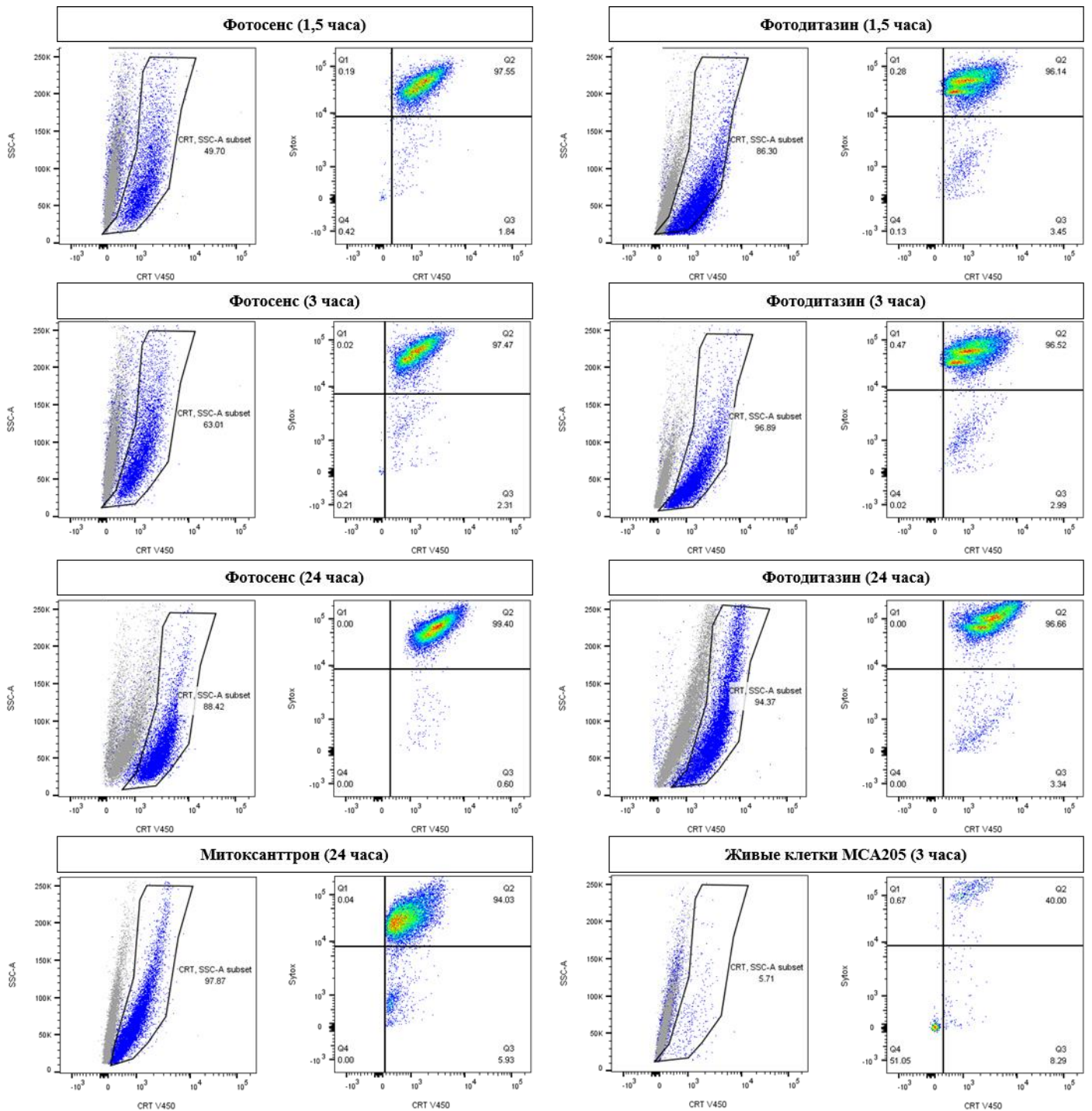


Рисунок 31. Диаграммы цитофлуорометрии с окрашенными клетками глиомы мыши GL261 антителами анти-кальретикулин и красителем Sytox Green. Для каждой группы показаны: диаграмма бокового (SSC) светорассеяния для суспензии относительно интенсивности окраски антителами анти-кальретикулин с выделенной областью популяции CRT⁺ клеток относительно изотип-контроля и квартильная диаграмма для определения CRT⁺Sytox⁻ популяции. Фотосенс (1,5 часа) и Фотодитазин (1,5 часа) – инкубация 1,5 часа после воздействия ФДТ, Митоксантрон - положительный контроль

Через 1.5 часа после фотодинамического воздействия уровень кальретикулина в экспериментальных группах «ФДТ-фотосенс» и «ФДТ-фотодитазин» превысил контрольные значения в среднем в 6 раз. Через 3 часа после воздействия уровень кальретикулина в группе «ФДТ-фотосенс» снизился до показателей культур клеток глиомы, не подверженных фотодинамическому воздействию, через 24 часа после индукции повышения уровня поверхностного кальретикулина также не зарегистрировано. Напротив, уровень кальретикулина в группе «ФДТ-фотодитазин» после 1,5 часов инкубации продолжал расти и превысил значения, установленные для живых клеток глиомы в 9 раз через 3 часа и в 12 раз после 24 часов инкубации. Уровень поверхностного кальретикулина на клетках, индуцированных фотосенсом превысил также значения группы «МТХ» с индукцией митоксантроном в 2,4 раза (рис. 30).

В отношении постоянной клеточной линии фибросаркомы МСА205 подтверждается возможность экспонирования кальретикулина на поверхности гибнущих клеток (рис. 32). Через 3 часа на клетках МСА205, индуцированных фотосенсом, детектировалось увеличение уровня кальретикулина в 5 раз по сравнению с контрольной группой. В группе культур МСА205, индуцированных фотодитазином после 3 часов инкубации, зарегистрировано повышение поверхностного кальретикулина в 7.8 раз по сравнению с группой, не подвергавшейся фотодинамическому воздействию.

Экспонирование кальретикулина (CRT) на клетках фибросаркомы MCA205

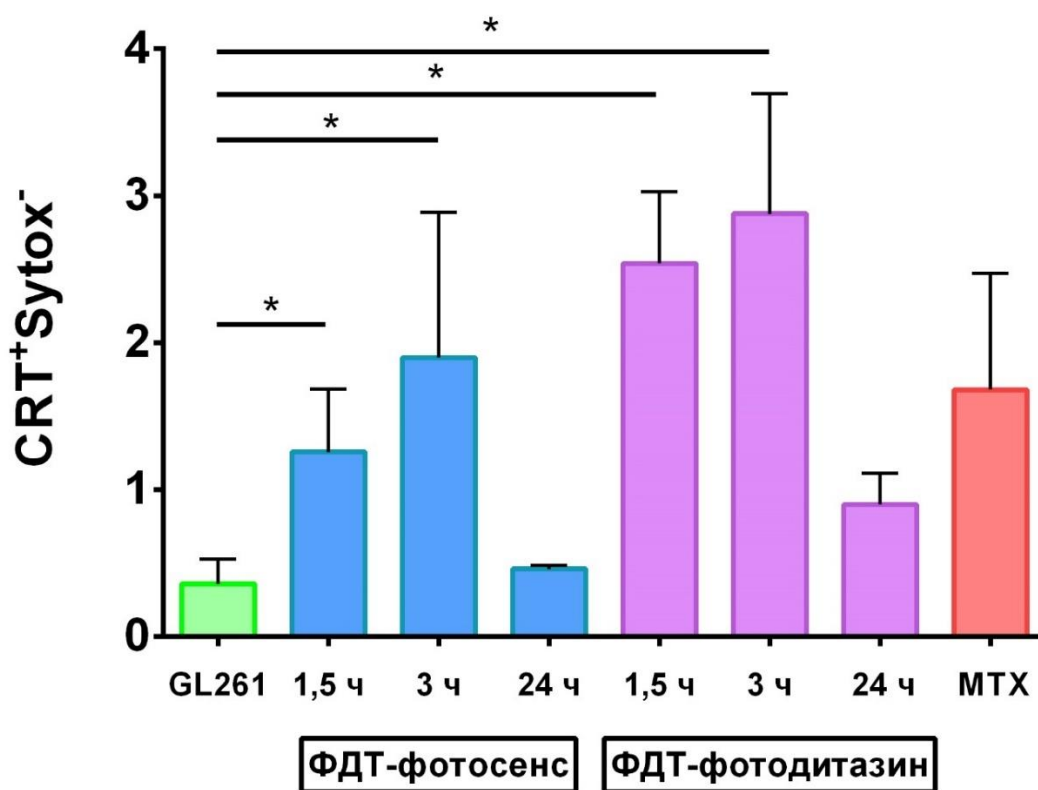


Рисунок 32. Экспонирование кальретикулина на поверхности мембраны клеток фибросаркомы MCA205, индуцированных фотодинамической терапией с применением фотосенса и фотодитазина. MTX – положительный контроль, клетки, индуцированные митоксантроном. Процент живых кальретикулин-положительных клеток оценивали методом проточной цитометрии. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего трех независимых экспериментов (каждый эксперимент проводился в двух технических повторах). * - $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни

В экспериментах показано, что клетки, индуцированные фотосенсом в течение короткого времени после индукции экспонируют кальретикулин на поверхности мембраны, что может быть связано с быстрым высвобождением гидролитических ферментов из лизосом и повреждение цитоплазматической мембраны (Berg and Moan, 1997). При этом фотодитазин обладает более «мягким» эффектом и клетки погибают постепенно, последовательно испуская сигналы DAMPs. Хотя обычно эффекты экспонирования кальретикулина на мембране

клеток связаны со стрессом эндоплазматического ретикулума (Garg et al., 2012; Krysko et al., 2012), необходимо дополнительно рассматривать ассоциацию этого внутриклеточного процесса с фотоиндукцией выбранными фотосенсибилизаторами.

9. Анализ фагоцитарной активности дендритных клеток

В моделировании иммунного ответа на опухолевые антигены дендритные клетки костного мозга были сокультивированы с опухолевыми линиями фибросаркомы MCA205 и глиомы GL261 в течение двух часов. Показано, что клетки, индуцированные всеми выбранными фотосенсибилизаторами, активно фагоцитируются антигенпрезентирующими клетками в различных соотношениях (рис. 33). В качестве контроля использовались дендритные клетки, сокультивированные с живыми неиндуцированными опухолевыми клетками.

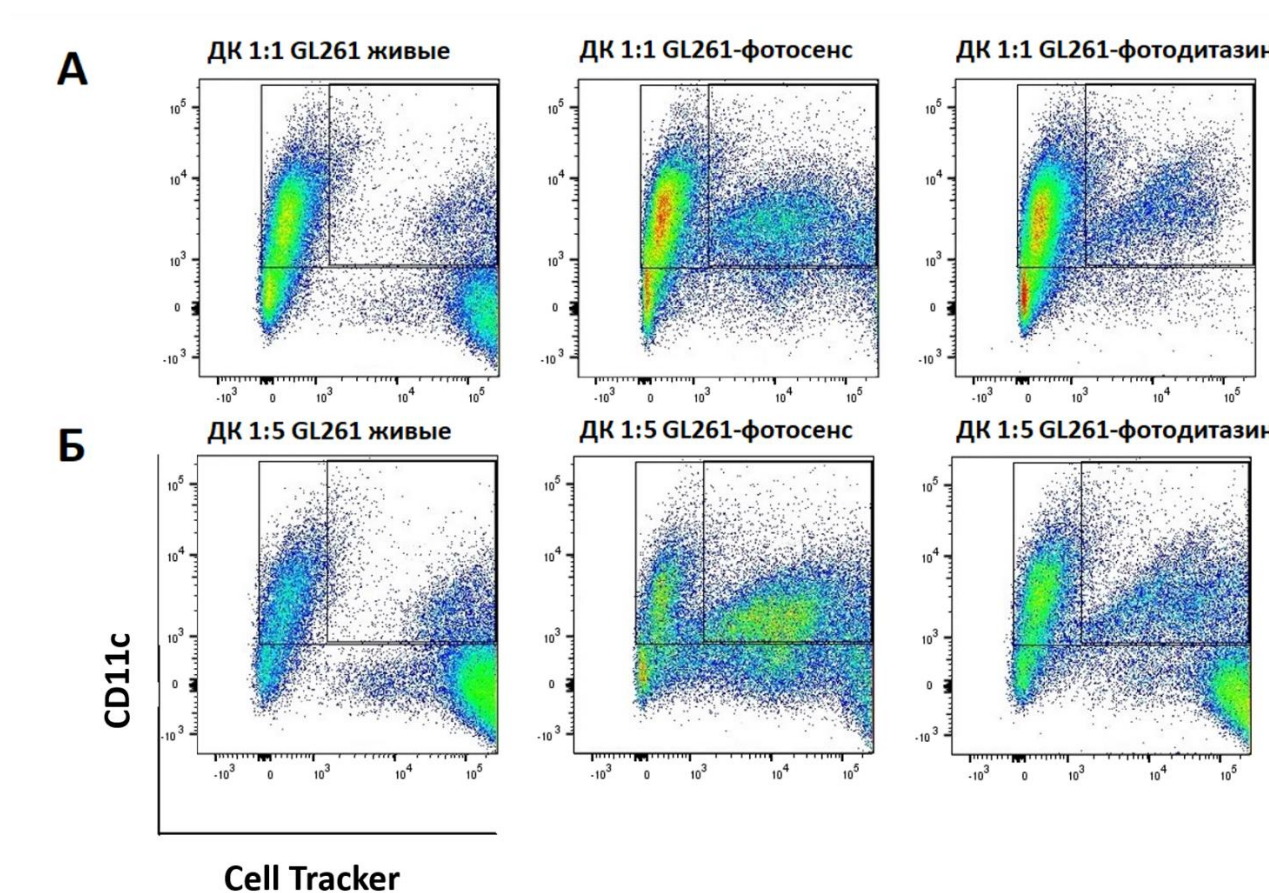


Рисунок 33. Репрезентативные диаграммы цитофлуорометрии с окрашенными дендритными клетками на специфический маркер дифференцировки

CD11c и окрашенными опухолевыми в соотношении 1:5. По оси ОУ – интенсивность флуоресценции CD11c - PE-A, окрашена популяция дендритных клеток, по оси ОХ – Cell Tracker Green-CMFDА, окрашена популяция целевых клеток

При сокультивировании дендритных клеток с живыми клетками глиомы GL261 в соотношении 1:1 процент фагоцитирующих ДК составил $18.3 \pm 4.2\%$ (рис. 32). Напротив, количество дендритных клеток, поглотившие фотоиндуцированные фотосенсом клетки, составило $42.3 \pm 6.5\%$ и превысило контрольные значения в $2,3 \pm 0,2$ раза (рис. 34). Индуцированные фотодитазином клетки вызвали поглощение $27.3 \pm 5.2\%$, что было выше контроля в $1,8 \pm 0,5$ раз. Процент фагоцитировавших дендритных клеток в группе «ДК+порфиразин I» привысил «ДК+живые GL261» в $2,4 \pm 0,1$ раз, когда как индукция поорфиразином III соответствующее значение контроля превысила в $1,2 \pm 1,0$ раза.

Фагоцитоз дендритными клетками

% от всей CD11c⁺ популяции

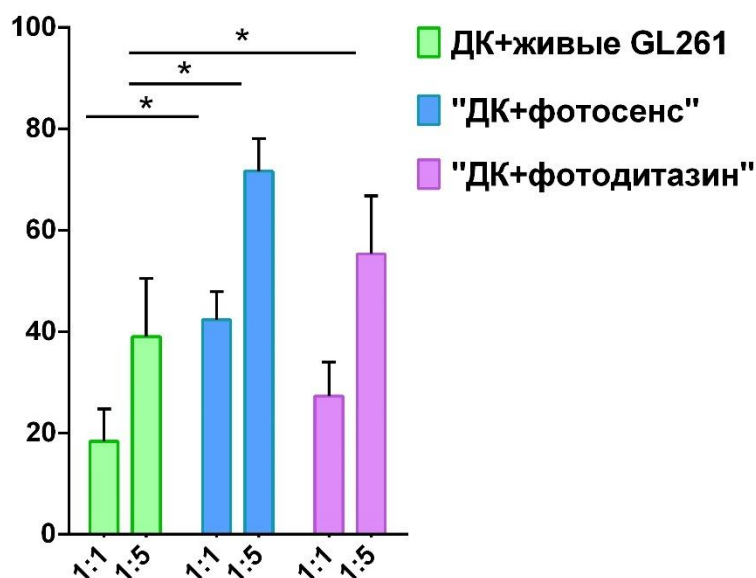


Рисунок 34. Количественный анализ фагоцитирующей способности дендритных клеток костного мозга мыши. В качестве целевых клеток использовались линии глиомы GL261 (А). Значения представлены как средние трех независимых экспериментов $\pm$ стандартная ошибка среднего, $*p \leq 0,01$, критерий Манна-Уитни

Количественная оценка фагоцитирующей активности ДК позволила установить, что при сокультивировании дендритных клеток с жизнеспособными клетками фибросаркомы МСА205 в соотношении 1:1 процент фагоцитирующих ДК составил $0.55 \pm 0.05\%$ (рис. 36). Напротив, количество ДК, поглотившие порфиразин I-ФДТ и порфиразин III-ФДТ индуцированные клетки МСА205, составило $3.27 \pm 0.65\%$ и $4.60 \pm 0.94\%$ соответственно, что выше значений контрольной группы в $1,4 \pm 0,3$ и $2,0 \pm 0,4$ раза.

дендритные клетки + GL261

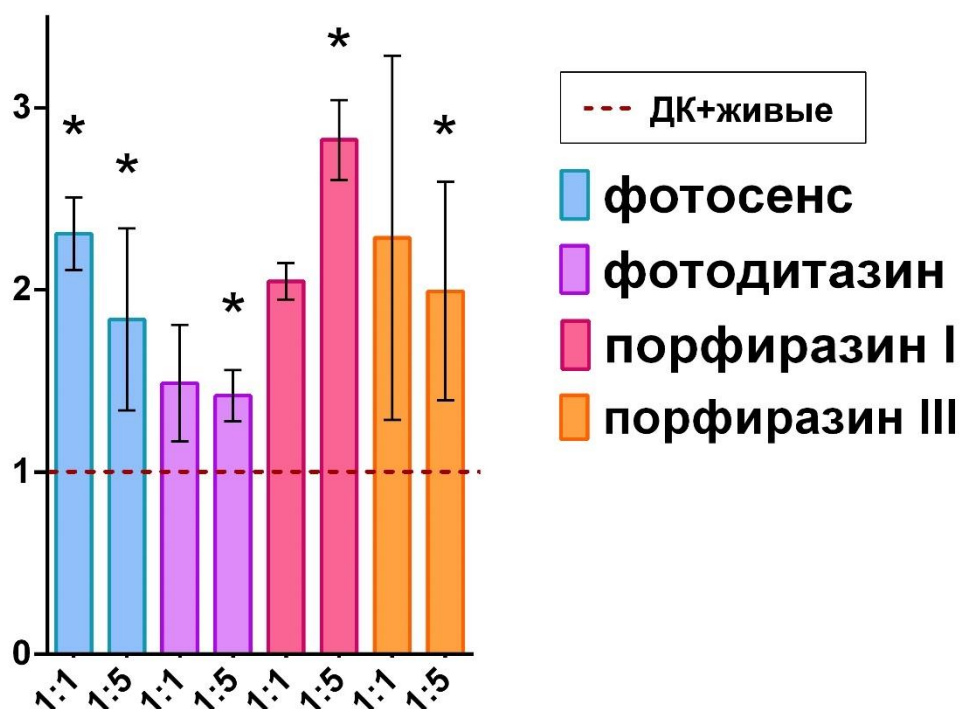


Рисунок 35. Количественный анализ фагоцитирующей способности дендритных клеток костного мозга мыши относительно контрольных образцов. Значения представлены как кратное увеличение процента целевых популяций относительно популяции дендритных клеток, сокультивированных с живыми клетками глиомы GL261. Представлены результаты трех независимых экспериментов $\pm$ стандартная ошибка среднего, $*p \leq 0,01$, критерий Манна Уитни

Схожая динамика наблюдалась при сокультивировании дендритных клеток с клетками глиомы GL261 в соотношении 1:5. Если для контрольной группы процент фагоцитирующих дендритных клеток составил $39.0 \pm 6.2\%$ (рис. 35), то в группе «фотосенс» и «фотодитазин» показатели антигенпрезентирующих клеток, поглотивших опухолевые клетки, составили $71.7 \pm 6.5\%$ и $55.3 \pm 7.4\%$ соответственно. Это превышало контрольные значения в $1,8 \pm 0,5$ и $1,4 \pm 0,1$ раза.

Аналогичная фагоцитирующая активность дендритных клеток показана в отношении клеток фибросаркомы MCA205, индуцированных ФДТ с применением исследуемых фотосенсибилизаторов (рис. 36). При сокультивировании дендритных клеток с живыми клетками фибросаркомы MCA205 в соотношении 1:5 процент фагоцитирующих антигенпрезентирующих клеток составил $22,0 \pm 4,6\%$, в то время как в группах «фотосенс» и «фотодитазин» данный показатель составил $65.33 \pm 8.08\%$ и $52.0 \pm 7.2\%$ соответственно. Показано увеличение процента фагоцитирующих дендритных клеток более чем в 2 раза.

дендритные клетки + MCA205

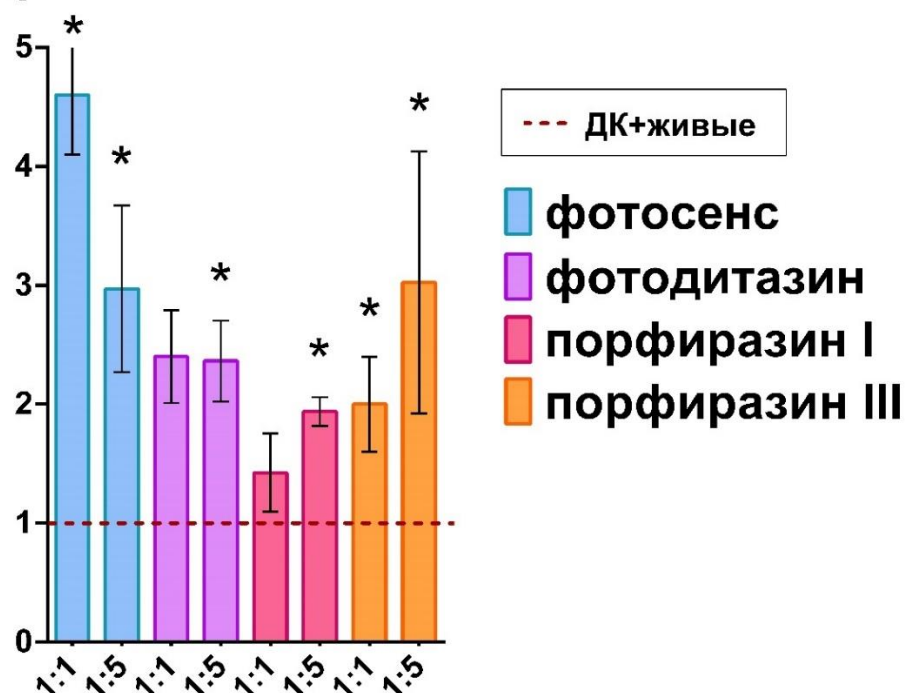


Рисунок 36. Количественный анализ фагоцитирующей способности дендритных клеток костного мозга мыши относительно контрольных образцов.

Значения представлены как кратное увеличение процента целевых популяций относительно популяции дендритных клеток, сокультивированных с живыми клетками фибросаркомы MCA205. Представлены результаты трех независимых экспериментов $\pm$ стандартная ошибка среднего, $*p \leq 0,01$, критерий Манна-Уитни

Похожая динамика наблюдалась при сокультивировании ДК с клетками фибросаркомы MCA205 в соотношении 1:5. Если в контрольной группе только 1.25 ± 0.06 % CD11c⁺ проявляли фагоцитирующую активность, то в группах «ДК+порфиразин I» и «ДК+порфиразин III» их количество составило 6.07 ± 1.42 % и 9.47 ± 3.29 % соответственно. То есть активация фагоцитарной активности при воздействии порфиразина I на опухолевые клетки увеличилась на $2,8 \pm 0,2$ раза.

10. Определение активационного статуса дендритных клеток

При презентации антигена на поверхности дендритных клеток происходит активация маркеров дифференировки CD80, CD86, CD40, которые выступают в качестве корцепторов, обеспечивающих активацию Т-клеток и формирование стойкого Т-клеточного иммунного ответа (Galluzzi et al., 2020). Исследуя фенотип дендритных клеток, можно судить об иммуногенности воздействия исследуемых фотосенсибилизаторов при проведении ФДТ.

Чтобы получить более полное представление о функциональном статусе дендритных клеток, были оценены иммуногенные свойства клеток глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205, убитых фотодинамической терапией с использованием исследуемых агентов. В частности, был проведен сравнительный анализ фенотипа ДК в присутствии ФДТ-индуцированных опухолевых клеток с активационным статусом ДК, сокультивированных с живыми ФДТ-неиндуцированными опухолевыми клетками. В качестве положительного контроля выступали дендритные клетки, которые были стимулированы липополисахаридом *E. coli* (LPS). В качестве отрицательного – дендритные клетки, сокультивированные с некротически-убитыми клетками (FT) (Gamrekelashvili et al., 2012; Aaes et al., 2016, Efimova et al., 2020). Следует отметить, что совместное культивирование ДК с клетками глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205, убитыми циклами

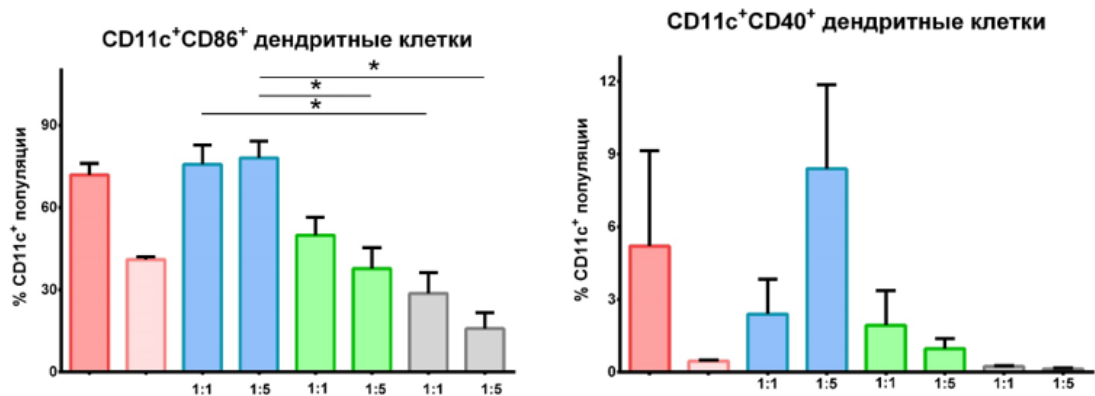
заморозки/оттаивания (F/T), не влияло на статус созревания дендритных клеток (Aaes et al., 2016; Efimova et al, 2020).

Показано, что умирающие клетки глиомы GL261, подвергшиеся фотодинамическому воздействию с применением фотосенса, индуцировали фенотипическое созревание дендритных клеток, на что рост поверхностной экспрессии ко-стимулирующей молекулы CD86 и CD40. CD86 связывается в качестве лиганда с костимулирующей молекулой CD28 на поверхности наивных CD8⁺T-клеток, стимулируя их к созреванию (Dyck and Mills, 2017). Для соотношения дендритных клеток к опухолевым 1:1 активация маркера дифференцировки CD86 зарегистрировано у $75.66 \pm 8.69\%$ ДК, для соотношения 1:5 данный показатель в среднем был равен $78.0 \pm 8.83\%$. Также для данной экспериментальной группы при соотношении 1:5 зарегистрирована экспрессия маркера дифференцировки CD40 у $8.4 \pm 2.0\%$ ДК (рис. 37). CD40 - важная костимулирующая молекула на поверхности антигенпрезентирующих клеток. CD40 является рецептором CD154, расположенного на Т-хелперах. Рецептор участвует в широком спектре иммунных и воспалительных реакции, включая развитие клеток памяти (Vonderheide, 2018).

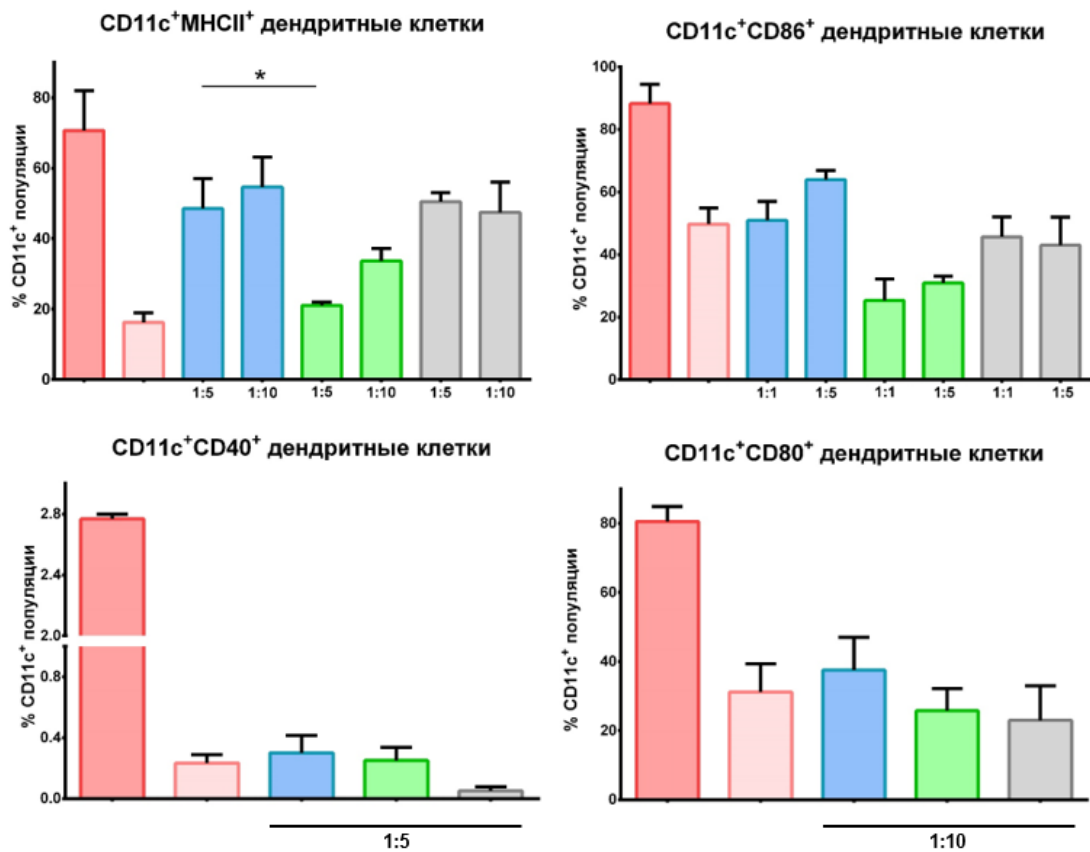
Дендритные клетки, сокультивируемые с клетками фибросаркомы MCA205, индуцированными фотодинамической терапией с применением фотосенса, слабо активировали маркеры дифференцировки CD40, CD80 и CD86, однако для данных экспериментальных групп установлена повышенная экспрессия главного комплекса гистосовместимости 2 класса (МНС II), важного для инициации иммунных ответов. Количество клеток, несущих на поверхности комплекс гистосовместимости второго класса, выросло по сравнению с контрольной группой более, чем в 1,8 раз.

Таким образом индукция фотосенсом опухолевых клеток вызывает созревание антигенпрезентирующих клеток, ассоциированное с активацией различных популяций Т-лимфоцитов.

Дендритные клетки + глиома GL261



Дендритные клетки + фибросаркома MCA205



- - ЛПС
- - ДК
- - ДК+фотосенс-индуцированные опухолевые клетки
- - ДК+живые опухолевые клетки
- - ДК+FT клетки

Рисунок 37. Определение фенотипического статуса дендритных клеток в экспериментальных группах при использовании фотосенса. Процент клеток,

экспрессирующих маркер дифференцировки CD86, CD40 на дендритных клетках, сокультивированных с индуцированными фотодинамической терапией клетками глиомы GL261 в соотношении 1:1 и 1:5. Процент клеток, экспрессирующих маркер дифференцировки CD86, CD40, CD80 и молекулы МНСII на дендритных клетках, сокультивированных с индуцированными фотодинамической терапией клетками фибросаркомы МСА205 в разных соотношениях. LPS – липополисахарид, F/T – клетки, подвергнутые 3 циклам замораживания/оттаивания. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего не менее трех независимых экспериментов. * - $p < 0.05$, t-тест Уэлча

Совместное культивирование с погибающими клетками глиомы GL261, индуцированными фотодинамической терапией на основе фотодитазина, активировало поверхностную экспрессию маркера дифференцировки CD40: в соотношении 1:5 опытная группа превышала контрольную «ДК + живые опухолевые клетки» в 3,5 раза, а контрольную группу «ДК + FT клетки» более, чем в 14 раз.

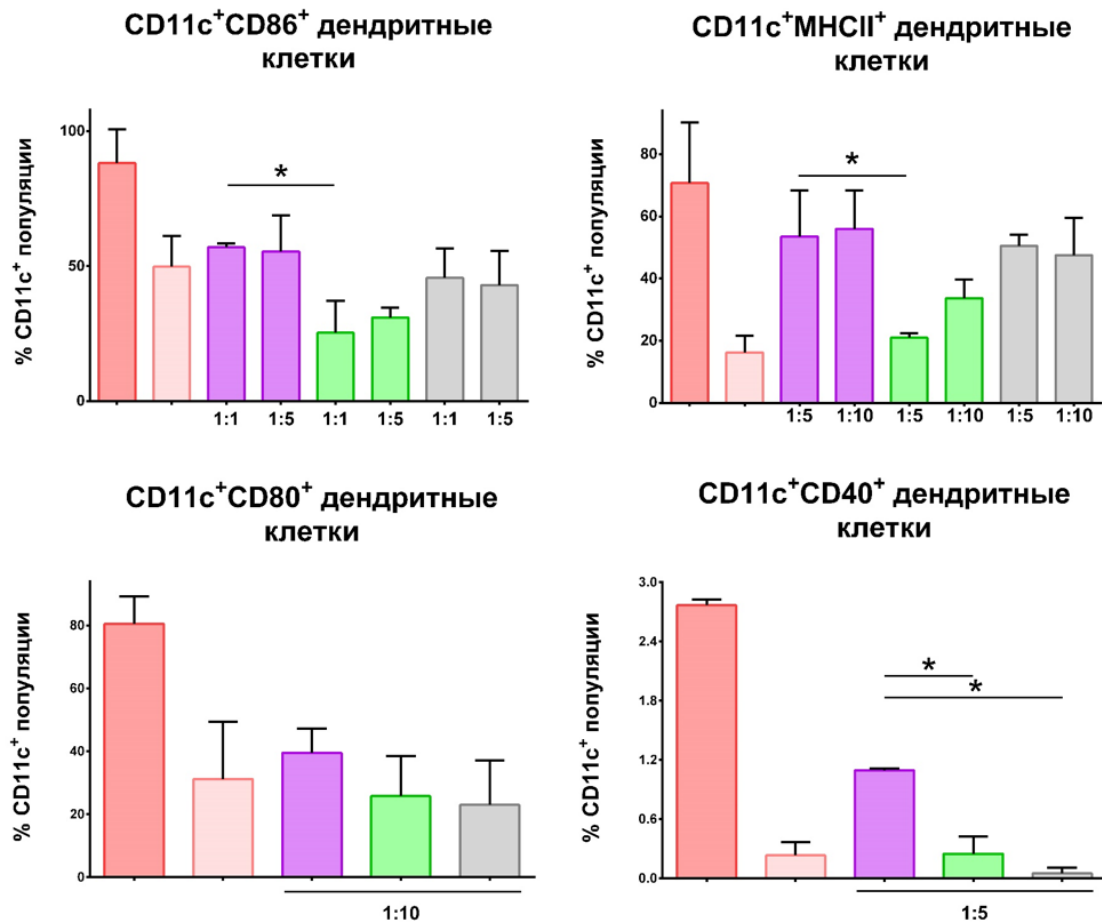
Дендритные клетки, сокультивируемые с клетками фибросаркомы МСА205, индуцированными фотодинамической терапией с применением фотодитазина, слабо активировали маркер дифференцировки CD80, однако для данных экспериментальных групп установлена повышенная экспрессия главного комплекса гистосовместимости 2 класса (МНС II), CD40 и CD86 костимулирующих молекул.

Живые опухолевые клетки активируют маркер CD86 на $31,0 \pm 2,0\%$ в соотношении 1:5, когда как группа использования фотодитазина – на $55,5 \pm 9,5\%$. Но достоверное повышение уровня созревания зарегистрировано при сокультивировании в соотношении 1:1: $25,33 \pm 6,8\%$ клеток, содержащих на поверхности CD86 костимулирующую молекулу в контрольной группе и $57,0 \pm 1,1\%$ в группе «ДК + фотодитазин-индуцированные клетки» (рис. 38). В этой же группе зафиксировано достоверное повышение количества клеток, несущих главный комплекс гистосовместимости II класса. Группа «ДК + фотодитазин-индуцированные клетки» экспонировала в 2,5 раза больше МНСII на поверхности

мембраны, чем контрольная группа сокультивирования с живыми опухолевыми клетками (рис. 38).

По результатам анализа показано, что фотодитазин-индуцированные клетки вызывали активацию антигенпрезентирующих клеток, что в норме физиологического ответа ведет к стимуляции развития специфических Т-клеточных популяций.

Дендритные клетки + фибросаркома MCA205



Дендритные клетки + глиома GL261

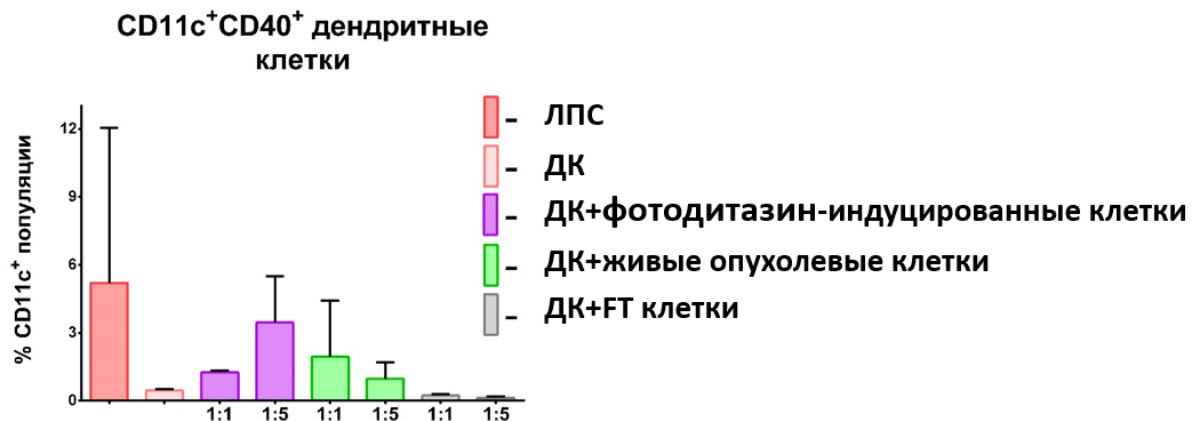


Рисунок 38. Определение фенотипического статуса дендритных клеток в экспериментальных группах при использовании фотодитазина. Процент клеток, экспрессирующих маркер дифференцировки CD86, CD80, CD40 и молекулы MHCII на дендритных клетках, сокультивированных с индуцированными фотодинамической терапией клетками фибросаркомы MCA205 в разных соотношениях. Процент клеток, экспрессирующих маркер дифференцировки CD40

на дендритных клетках, сокультивированных с индуцированными фотодинамической терапией клетками глиомы GL261 в разных соотношениях. LPS – липополисахарид, F/T – клетки, подвергнутые 3 циклам замораживания/оттаивания. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего не менее трех независимых экспериментов. * - $p < 0.05$, t-тест Уэлча

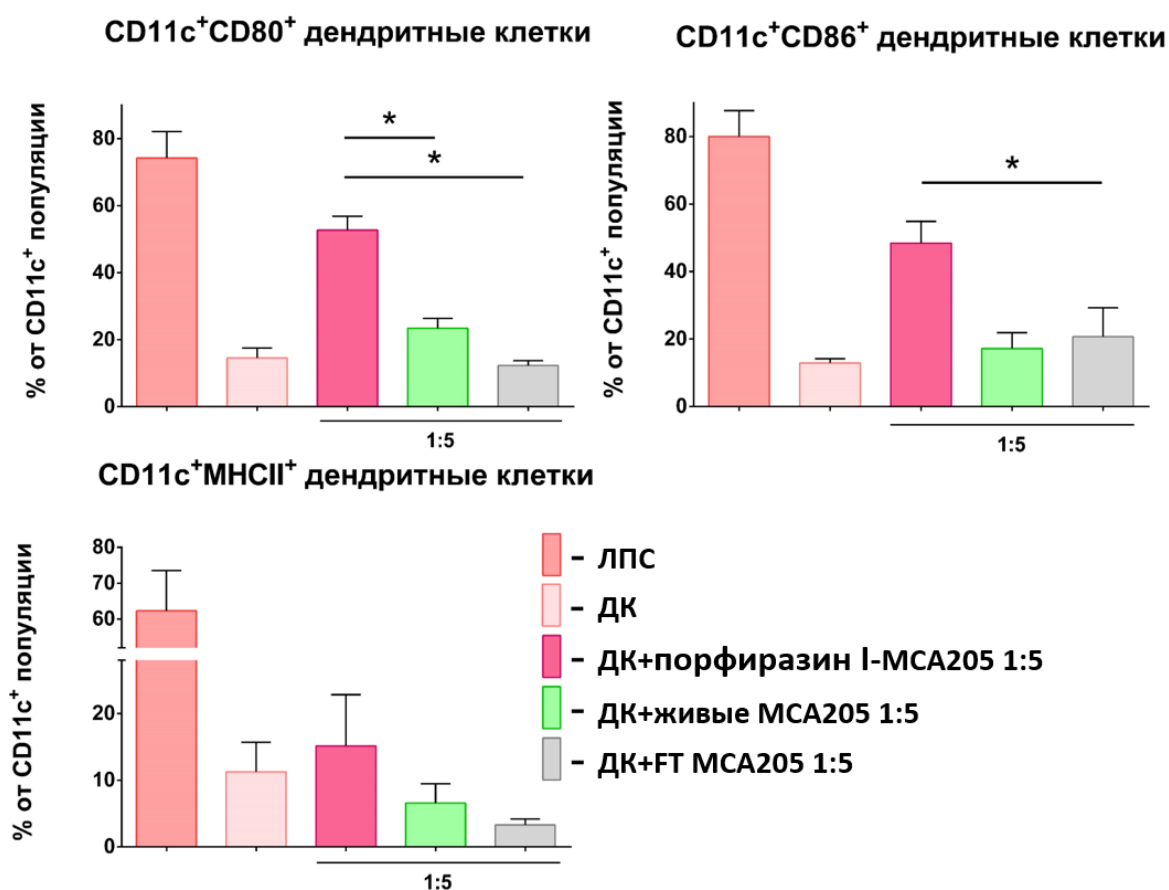


Рисунок 39. Определение фенотипического статуса дендритных клеток в экспериментальных группах при использовании порфиразина I. Процент клеток, экспрессирующих маркер дифференцировки CD80, CD86 и молекулы MHCII на дендритных клетках, сокультивированных с индуцированными фотодинамической терапией клетками фибросаркомы MCA205 в соотношении 1:5. LPS – липополисахарид, F/T – клетки, подвергнутые 3 циклам замораживания/оттаивания. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего не менее трех независимых экспериментов. * - $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни

В результате сокультивирования линии фибросаркомы МСА205 с дендритными клетками, последние активировали на поверхности маркеры дифференцировки CD80 и CD86, но не молекулы МНСII (рис. 39).

23,38±2,9% дендритных клеток, сокультивированных с живыми опухолевыми клетками экспонировали на поверхности костимулирующую молекулу CD80. Группа «ДК + FT клетки» дендритных клеток при этом содержала 12,26±1,5% популяции с CD80 маркером. Целевая группа «ДК + порфиразин I – МСА205 1:5» имела достоверно больше популяцию содержащих CD80⁺ клеток – 52,7±4,1%.

Помимо этого, порфиразин I, индуцировавший клетки фибросаркомы, повышал количество CD86⁺ клеток, что достоверно отличается от группы отрицательного контроля: произошло увеличение популяции в 2,4 раза (рис. 39).

При исследовании свойств порфиразина III показано, что умирающие индуцированные опухолевые клетки активируют созревание антигенпрезентирующих клеток, увеличивая количество молекул CD86 и CD80.

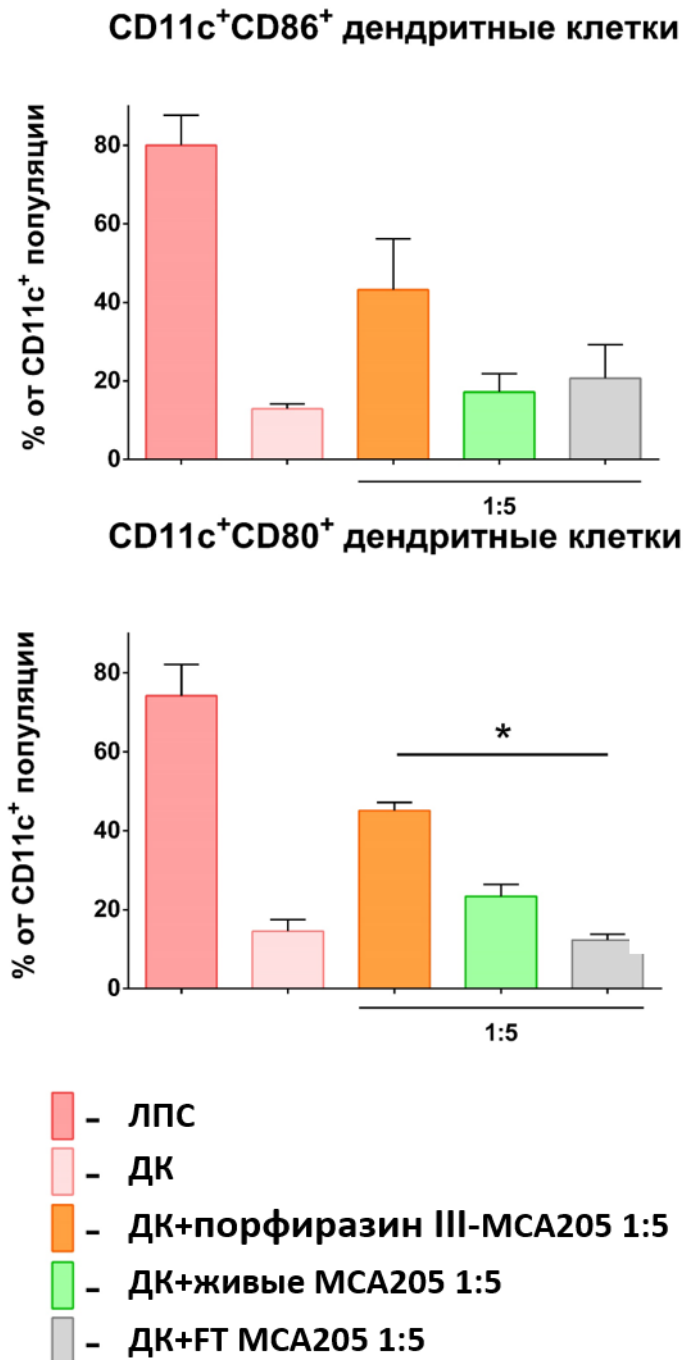


Рисунок 40. Определение фенотипического статуса дендритных клеток в экспериментальных группах при использовании порфиразина III. Процент клеток, экспрессирующих маркер дифференцировки CD86 и CD80 на дендритных клетках, сокультивированных с индуцированными фотодинамической терапией клетками фибросаркомы МСА205 в соотношении 1:5. LPS – липополисахарид, F/T – клетки, подвергнутые 3 циклам замораживания/оттаивания. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего не менее трех независимых экспериментов. * - $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни

Использование порфиразина III в 2,5 раза увеличивало количество CD86⁺ дендритных клеток по сравнению живыми клетками фибросаркомы и в 2 раза относительно негативного контроля (рис. 40).

Такая же тенденция при анализе маркера CD80 на поверхности дендритных клеток: $45,08 \pm 2,0\%$ дендритных клеток в группе «ДК + порфиразин III – MCA205 1:5» содержали указанный маркер, что в 1,9 раз превышает данный показатель контрольной группы и в 3,6 раза - группы негативного контроля.

Таким образом, четыре различных по химической природе фотосенсибилизатора при индукции двух разных типов опухолевых клеток являются мощными индукторами фагоцитирующей активности антигенпрезентирующих клеток и обеспечивают их фенотипическое созревание.

11. Анализ высвобождаемого IL-6 активированными антигенпрезентирующими клетками

Для подтверждения активации дендритных клеток в присутствии ФДТ-индуцированных клеток глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205 был проведен количественный анализ содержания высвобождаемого интерлейкина 6 в клеточных супернатантах после 24 часового совместного культивирования.

При типичном иммунном ответе антигены захватываются дендритными клетками, которые затем созревают и представляют антигенный пептид в контексте молекул МНС I и II классов Т-клеткам в лимфатических узлах, генерируя эффекторные Т-клетки. Т-лимфоциты мигрируют к участкам инфекции, воспаления или повреждения. IFN- γ и GM-CSF играют центральную роль в процессе созревания ДК и активации макрофагов. Дендритные клетки, в свою очередь, высвобождают цитокины, такие как IL-1 β , IL-6, IL-12 или TNF, которые формируют ответы естественных киллерных клеток (NK) и Т-клеток (Showalter et al., 2017).

В отношении клеток фибросаркомы МСА205 было показано достоверное повышение уровня интерлейкина 6 (IL-6) при сокультивировании ДК как с фотосенс-ФДТ, так и с фотодитазин-ФДТ индуцированными клетками МСА205 в разных соотношениях (рис. 41). Если в клеточных супернатантах контрольной группы «ДК+живые МСА205» количество IL-6 составило $63,43 \pm 3,27$ пг/мл в самом большом соотношении 1:10, то его содержание в группах «ДК+фотосенс» 1:10 и «ДК+фотодитазин» 1:10 составило $423,9 \pm 130,1$ пг/мл и $634,0 \pm 113,5$ пг/мл соответственно. В группе отрицательного контроля, где ДК были сокультивированы с клетками МСА205, подвергшимися замораживанию/оттаиванию (FT), уровень высвобождаемого цитокина был также достоверно ниже опытных групп ($48,92 \pm 7,81$ пг/мл).

IL-6

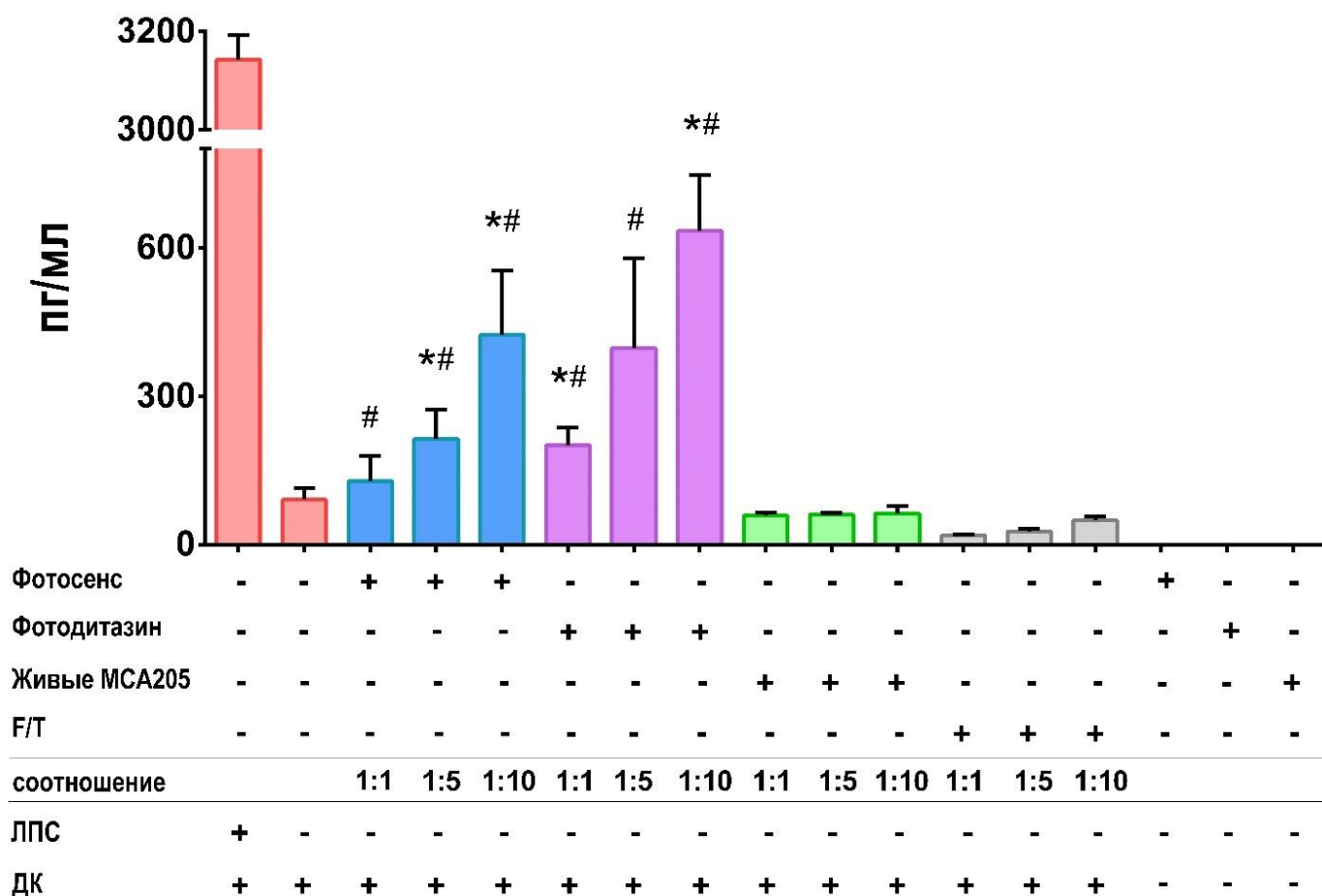


Рисунок 41. Количество секретируемого IL-6 дендритными клетками, сокультивированными в разных соотношениях с опухолевыми фотоиндуцированными клетками фибросаркомы в соотношении 1:1, 1:5 и 1:10. . LPS – липополисахарид, F/T – клетки, подвергнутые 3 циклам замораживания/оттаивания. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего не менее трех независимых экспериментов. * - достоверные различия в сравнении с группой F/T, $p < 0.01$, # - достоверные различия в сравнении с группой Живые MCA205, $p < 0.01$, t-тест с поправкой Бонферрони

12. Моделирование профилактической противоопухолевой вакцинации *in vivo*

На следующем этапе выполнения работ была исследована способность опухолевых клеток, подвергшихся фотодинамическому воздействию с применением исследуемых фотоагентов, индуцировать стойкий адаптивный иммунный ответ. Для этого нами была использована верифицированная

экспериментальная модель профилактической противоопухолевой вакцинации *in vivo* с применением клеток постоянной клеточной линии фибросаркомы МСА205. Данная модель широко применяется в исследованиях эффективности активации иммунной системы в ответ на индукторы клеточной смерти опухолевых клеток (Garg et al., 2016, Love Aaes et al, 2016; Efimova et al., 2020).

Была проведена иммунизация самок мышей линии C57BL/6J клетками фибросаркомы МСА205, погибающих в результате фотодинамического воздействия с применением фотосенса, фотодитазина., порфиразина I и порфиразиина III. Контрольной группе мышей инъецировали PBS, либо клетки МСА205, погибшие в результате проведения нескольких циклов замораживания\оттаивания. Вакцинированным мышам в последствие осуществлялось инъецирование живых опухолевых клеток.

В результате проведенных исследований было показано, что у мышей, иммунизированных ФДТ-индуцированными клетками МСА205, наблюдались признаки активации адаптивной иммунной системы и надежной защиты от опухолевого роста (рис. 42). В экспериментальных группах «ФДТ-фотосенс» и «ФДТ-фотодитазин» отсутствие роста опухоли в области инъекции живых раковых клеток регистрировалось в 100% и 83% случаях соответственно. Высокая доля выживаемости животных указывает на выраженные иммуногенные свойства применяемых фотосенсибилизаторов. Интересно отметить, что действие вакцинации F/T клетками не было эффективным. Процент животных, для которых не зарегистрирован опухолевый рост, составил 80% на 20 день после вакцинации, но к концу эксперимента все животные имели опухоль на прививаемой стороне. Это подтверждает ранее опубликованные данные, согласно которым случайные некротические клетки обладают меньшей иммуногенностью (Love Aaes et al., 2016).

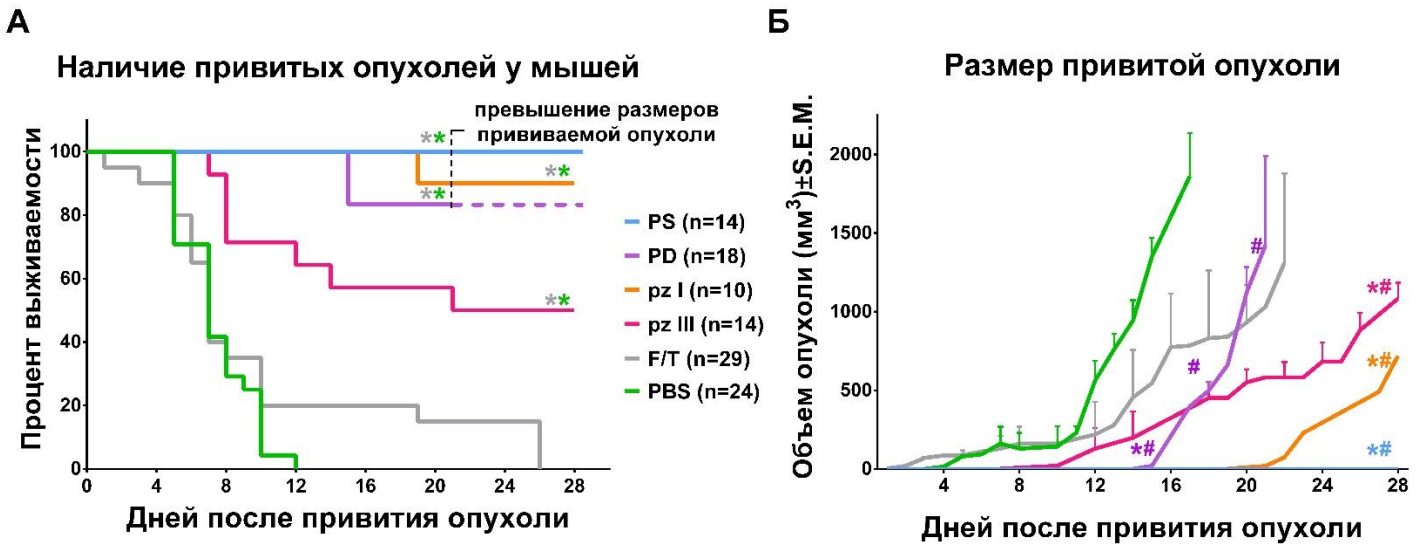


Рисунок 42. Вакцинация мышей умирающими клетками фибросаркомы MCA205, индуцированными фотодинамической терапией на основе фотосенса (PS), фотодитазина (PD), порфиразина I (pz I) и порфиразина III (pz III). **А** – кривая Каплана-Мейера иллюстрирует наличие у мышей опухоли на прививаемой стороне после вакцинации умирающими клетками. Результаты представлены процентом мышей, не имеющих опухоли на прививаемой стороне. * $p < 0,01$, логарифмический критерий Мантеля-Кокса. **Б** – размер прививаемой опухоли после вакцинации. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. *,# - $p < 0,05$. * - статистически значимое отличие от группы PBS; # - статистически значимое отличие от группы F/T, критерий Уилкоксона

В группе «pz III-ФДТ» отсутствие роста опухоли в области инъекции жизнеспособных клеток MCA205 регистрировалось в 50% случаях. Более выраженные иммуногенные свойства фотосенсибилизатора и надежная защита от опухолевого роста продемонстрированы для группы «pz I-ФДТ», процент выживаемости животных в которой составил 90%.

Важным этапом стала оценка роли адаптивного иммунитета в противоопухолевой защите. Будучи бестимусными, мыши линии Nude не продуцируют зрелые Т-клетки и демонстрируют пониженное количество циркулирующих лимфоцитов по сравнению с контролем дикого типа или гетерозиготным контролем (Wettersten et al., 2014). То есть невозможность Т-клеточных популяций в участии адаптивных иммунных реакций приводит к развитию патологического процесса даже при стимулировании иммунитета.

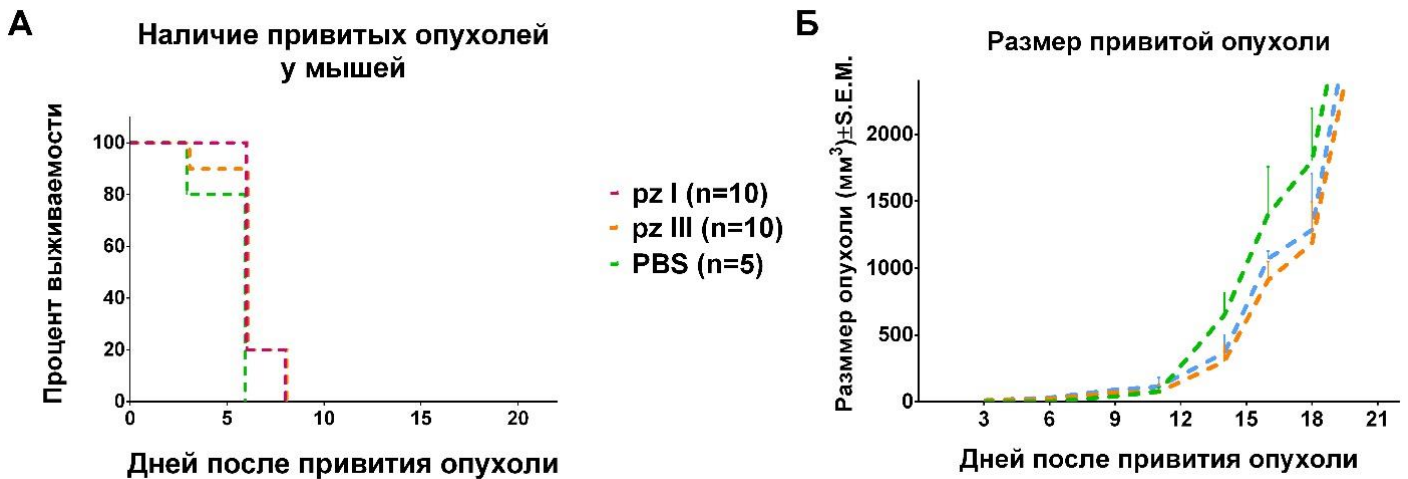


Рисунок 43. Вакцинация иммунодефицитных мышей умирающими клетками фибросаркомы MCA205, индуцированными фотодинамической терапией на основе порфиразинов. **А** – кривая Каплана-Мейера иллюстрирует наличие у мышей опухоли на прививаемой стороне после вакцинации умирающими клетками. Результаты представлены процентом мышей, не имеющих опухоли на прививаемой стороне, логарифмический критерий Мантеля-Кокса. **Б** – размер прививаемой опухоли после вакцинации. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, критерий Уилкоксона

Проведение вакцинации фотоиндуцированными клетками фибросаркомы MCA205 иммунодефицитных мышей линии Nude подтвердило значимый вклад адаптивной иммунной системы в реализации противоопухолевого ответа (рис. 43). Рост опухоли в области инъекции жизнеспособных опухолевых клеток наблюдался во всех экспериментальных группах в 100% случаях. При этом развитие опухолевого процесса было более интенсивным, чем у иммунокомпетентных животных. Размер опухоли свыше 2 мм³ регистрировался к 18-19 дням после инъекции живых клеток MCA205.

13. Визуализация опухолевого очага магнитно-резонансной томографией

Для визуализации опухолевого очага проведена магнитно-резонансная томография животных на 19 день после вакцинации в эксперименте *in vivo*. Визуализировали опухоль на прививаемой стороне, Получены снимки брюшной полости с фронтальными срезами.

Наблюдающийся опухолевый очаг у мыши, перенесшей прививку умирающими фотоиндуцированными порфиразином III опухолевыми клетками в 2,5 раза меньше в аксиальной и сагиттальной плоскости, чем опухолевый очаг у мышей, перенесших инъекцию PBS, и в 1,4 раза меньше во фронтальной плоскости (рис. 44, 45).

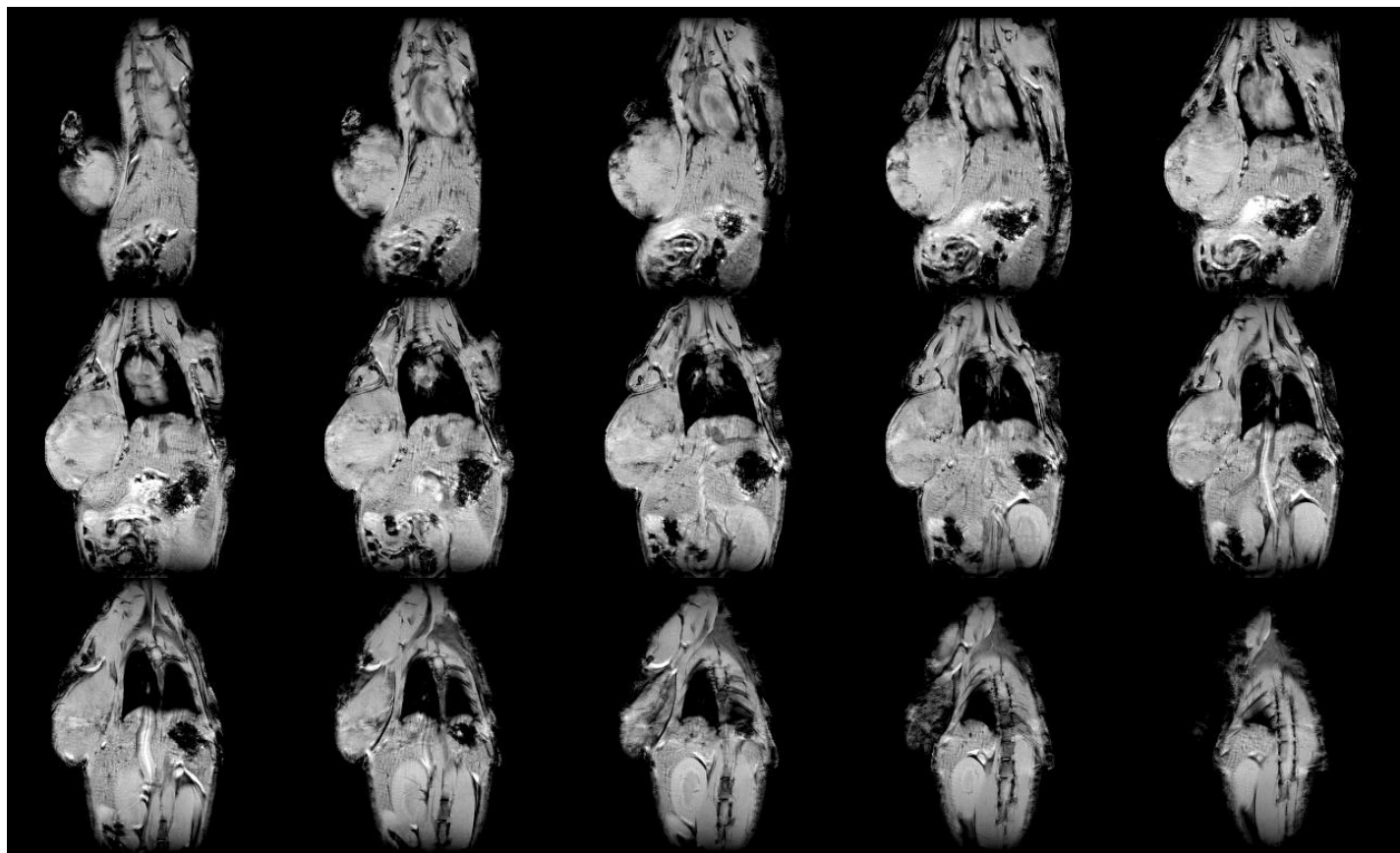


Рисунок 44. Репрезентативные томографическое изображение фронтальных срезов брюшной полости мыши с развитым опухолевым очагом (19 день после инокуляции), перенесшей прививку умирающих фотоиндуцированных порфиразином III опухолевых клеток. TR=1000 мс, TE=1.49мс, количество эхо – 6, FOV – 20x20 мм, толщина среза – 1 мм

Группа мышей «pz III» имела 50% выживаемость мышей в эксперименте превентивной противоопухолевой вакцинации, 7 мышей имели выраженный опухолевый очаг. При этом опухоли не вызывали искажение брюшной полости, что происходило у контрольных мышей (группа «PBS»).

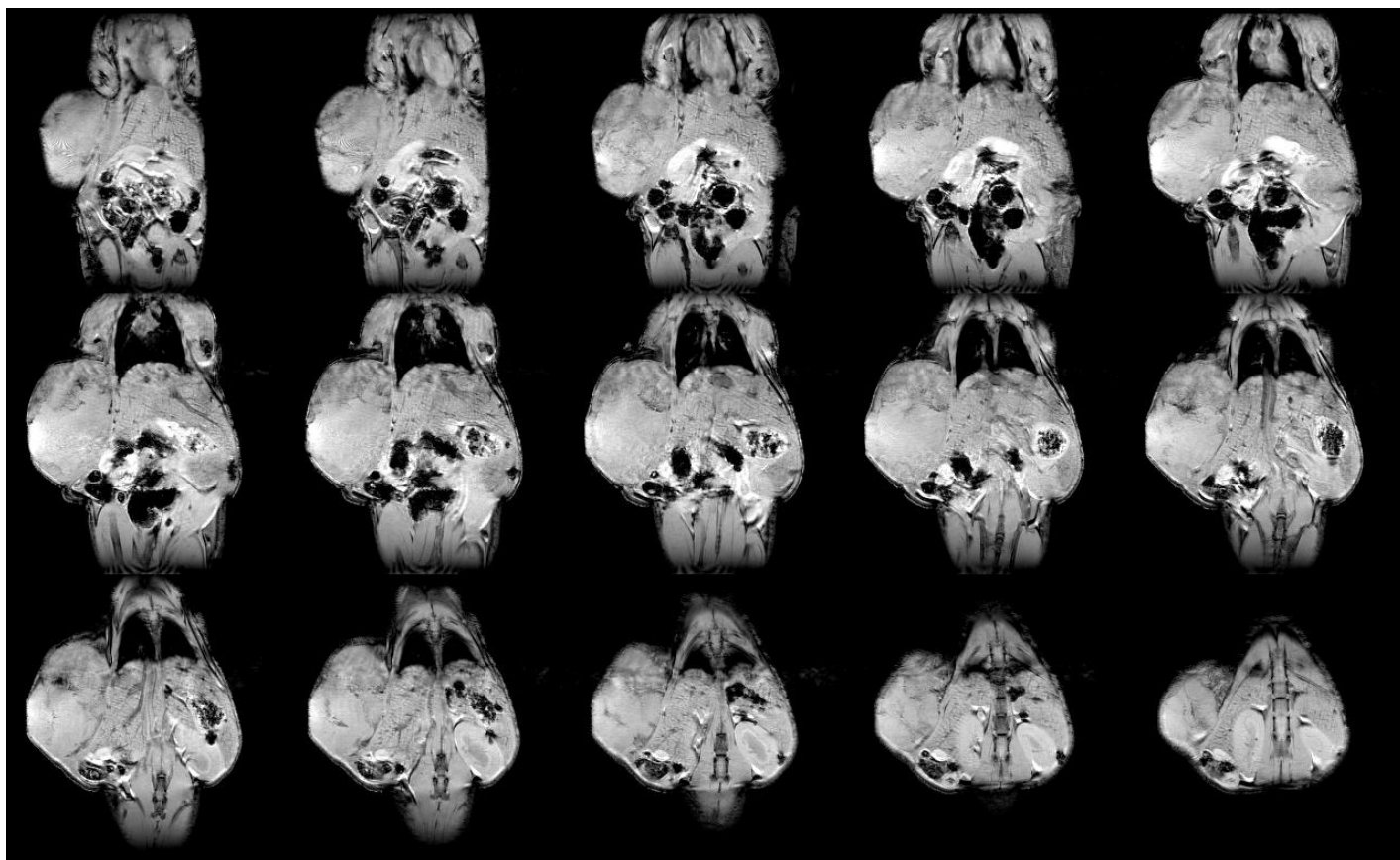


Рисунок 45. Репрезентативные томографическое изображение фронтальных срезов брюшной полости мыши с развитым опухолевым очагом (19 день после инокуляции), контрольная группа с инъекцией PBS. TR=1000 мс, TE=1.49мс, количество эхо – 6, FOV – 20x20 мм, толщина среза – 1 мм.

Таким образом показан выраженный противоопухолевый эффект применения умирающих фотоиндуцированных клеток в качестве вакцины *in vivo*. Необходимо оптимизировать условия применения опухолевых клеток, погибающих вследствие иммуногенной клеточной смерти *in vivo* для достижения лучшего профилактического и терапевтического эффекта.

14. Моделирование превентивной вакцинации от глиом умирающими фотоиндуцированными клетками

В экспериментах *in vitro* фотосенс вызывал наибольшее высвобождение DAMPs при фотоиндукции, активировал фагоцитарную активность и созревание антигенпрезентирующих клеток, а также в модели превентивной вакцинации *in*

vivo от подкожной опухоли фибросаркомы показал мощный протективный эффект от развития опухолевого очага.

Была проведена иммунизация самок мышей линии C57BL/6J 6-8- недель клетками глиомы мыши GL261, умирающими вследствие фотоактивации фотосенса. Модель уникальна технологией двойной иммунизации ФДТ-вакциной на основе умирающих клеток с последующей инокуляцией живых клеток глиомы подкожно. В промежуточных экспериментах было показано, что однократное введение вакцины не вызывало активации противоопухолевой защиты (рис. 46 А), поэтому протокол был адаптирован для увеличения стимула индукции иммунного ответа. При одноразовой иммунизации опухоли на прививаемой стороне у всех групп животных начали появляться на 3-5 день после инокуляции, и к концу второй недели все животные были подвержены развитию опухолевого очага. При этом, активный рост опухоли наблюдался лишь в группах контроля привития «PBS» и негативного контроля – клеток, подверженных замораживанию/оттаиванию (FT) (рис. 46 Б). Эти результаты демонстрируют, что активация иммунного ответа происходит, но недостаточно эффективно.

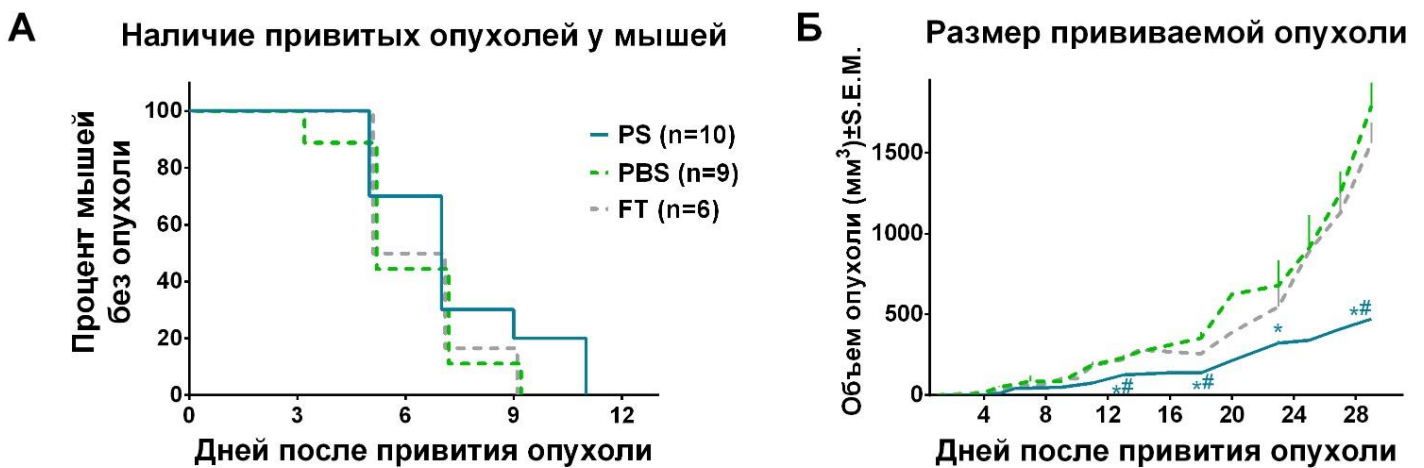


Рисунок 46. Вакцинация мышей умирающими клетками глиомы GL261, индуцированными фотодинамической терапией на основе фотосенса (PS). FT – клетки, подвергшиеся циклам замораживания/оттаивания. А – кривая Каплана-Мейера иллюстрирует наличие у мышей опухоли на прививаемой стороне после

вакцинации умирающими клетками. Результаты представлены процентом мышей, не имеющих опухоли на прививаемой стороне, логарифмический критерий Манталя-Кокса. **Б** – размер прививаемой опухоли после вакцинации. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. *,# - $p < 0,05$. * - статистически значимое отличие от группы PBS; # - статистически значимое отличие от группы F/T, критерий Уилкоксона

В результате проведенных исследований было показано, что у мышей, дважды иммунизированных ФДТ-индуцированными клетками глиомы наблюдались признаки активации адаптивного иммунитета (рис. 47). В экспериментальной группе «PS» (фотосенс-индуцированные клетки) все животные были защищены от роста и развития опухоли. Применение вакцины на основе клеток, убитых замораживанием/оттаиванием, вызвало развитие опухолевого очага у 50% животных. Тем не менее показано значимое отличие группы «PS» от негативного контроля, что предполагает качественно разные эффекты вакцин на основе умирающих клеток.

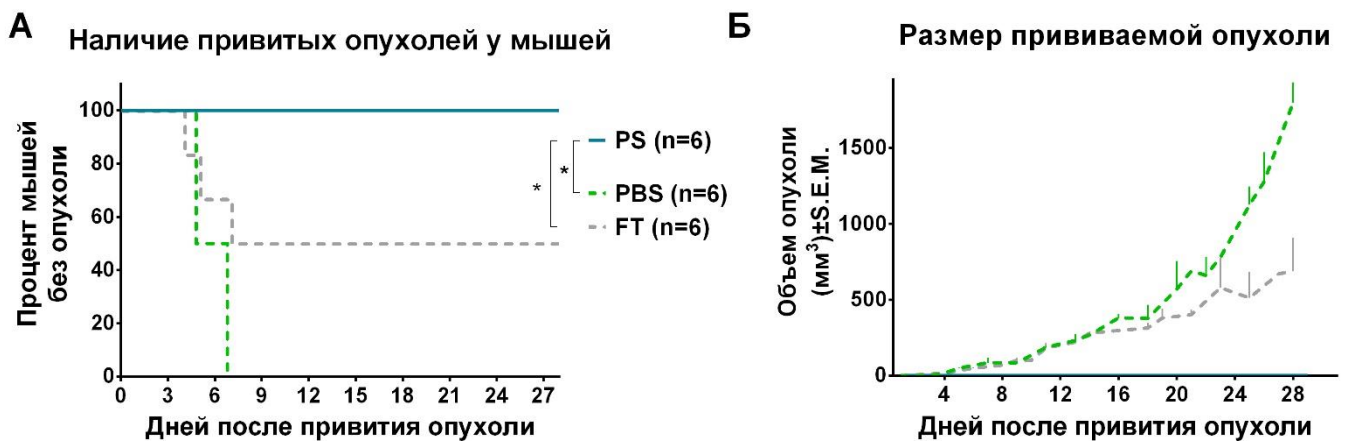


Рисунок 47. Двойная иммунизация мышей умирающими клетками глиомы GL261, индуцированными фотодинамической терапией на основе фотосенса (PS). FT – клетки, подвергшиеся циклам замораживания/оттаивания. **А** – кривая Каплана-Мейера иллюстрирует наличие у мышей опухоли на прививаемой стороне после двойной вакцинации умирающими клетками. Результаты представлены процентом мышей, не имеющих опухоли на прививаемой стороне. * $p < 0,01$, логарифмический критерий Манталя-Кокса. **Б** – размер прививаемой опухоли после вакцинации. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего

В результате показаны иммуногенные свойства вакцины на основе умирающих ФТД-активированных клеток глиомы мыши GL261 в сингенной модели. Данные результаты позволяют разработать и апробировать эффективную превентивную вакцину от глиомы головного мозга на основе профессиональных антигенпрезентирующих клеток (по Garg et al., 2016).

15. Моделирование профилактической противоопухолевой вакцинации дендритноклеточной вакциной *in vivo*

В этой модели активированные дендритные клетки выступают мощным стимулом для активации Т-клеточных популяций. Иммуногенная клеточная смерть опухолевых клеток глиомы, вызванная фотодинамическим воздействием, вызывает фенотипическое созревание дендритных клеток *in vitro*. Вакцина на основе активированных дендритных клеток дважды вводится животному для эффективной иммунизации. Развитие опухолевого очага в головном мозге моделируется введением по стереотаксическим координатам суспензии живых опухолевых клеток.

В модели оценены выживаемость животных, магнитно-резонансной томографией визуализирован опухолевый очаг в головном мозге, оценен размер развивающихся образований, проанализирован неврологический статус животных в ходе эксперимента.

В результате использования дендритной вакцины на основе фотоиндуцированных клеток, умирающих по иммуногенному пути, показано, что выживаемость мышей значительно выше в сравнении с не вакцинированными мышами. С 15 по 18 день после инокуляции клеток в мозг все мыши контрольной группы погибли (рис. 48). При этом, выживаемость животных, получивших дендритную вакцину на основе некротически-погибших клеток, не отличалась от контроля привития опухолевых клеток.

Выживаемость животных

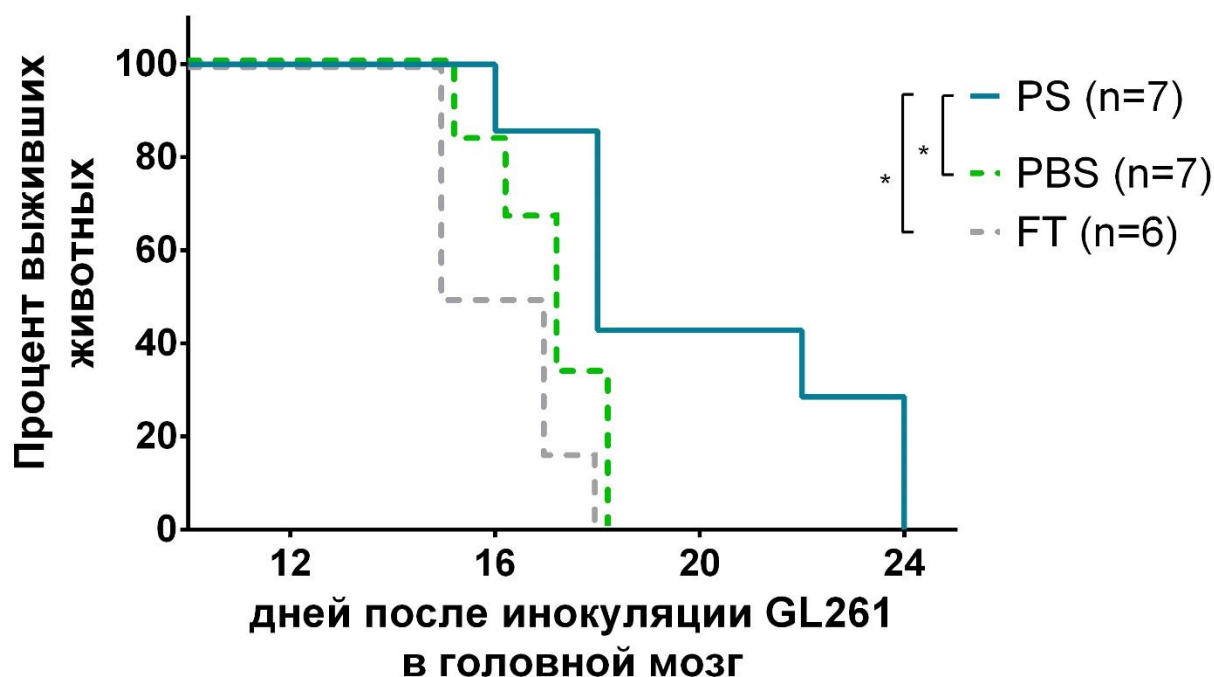


Рисунок 48. Вакцинация мышей дендритноклеточной вакциной на основе умирающих фотоактивированных фотосенсом клеток (PS). FT – применение дендритноклеточной вакцины на основе некротически-погибших клеток глиомы. Кривая Каплана-Мейера иллюстрирует выживаемость мышей в эксперименте. Результаты представлены процентом выживших животных. * - $p < 0,05$, логарифмический критерий Мантеля-Кокса

При помощи магнитно-резонансной томографии был визуализирован опухолевых очаг у мышей на 11 и 18 день после инокуляции живых клеток в головной мозг (табл. 2). До 11 дня опухоль у животных не вызывала значительных поражений сосудистой сети и некротических очагов, а также не наблюдалось изменения архитектуры свода черепа.

Табл. 2. Объем опухолевого очага в головном мозге мышей линии C57BL/6J разных экспериментальных групп после инокуляции живых клеток глиомы мыши GL261. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n \geq 2$

	PBS	FT	PS
11 день	$0,41 \pm 0,05 \text{ см}^3$	$0,62 \pm 0,04 \text{ см}^3$	$0,63 \pm 0,08 \text{ см}^3$
18 день	$1,04 \pm 0,55 \text{ см}^3$	$1,34 \pm 0,55 \text{ см}^3$	$0,78 \pm 0,05 \text{ см}^3$

На 11 день после моделирования глиомы головного мозга у не вакцинированных животных (PBS) опухолевый очаг имел объем $0,41 \pm 0,05 \text{ см}^3$, располагался левее брегмы, вдоль сагиттального шва, распространяясь поверхностно по коре (рис. 49 А).

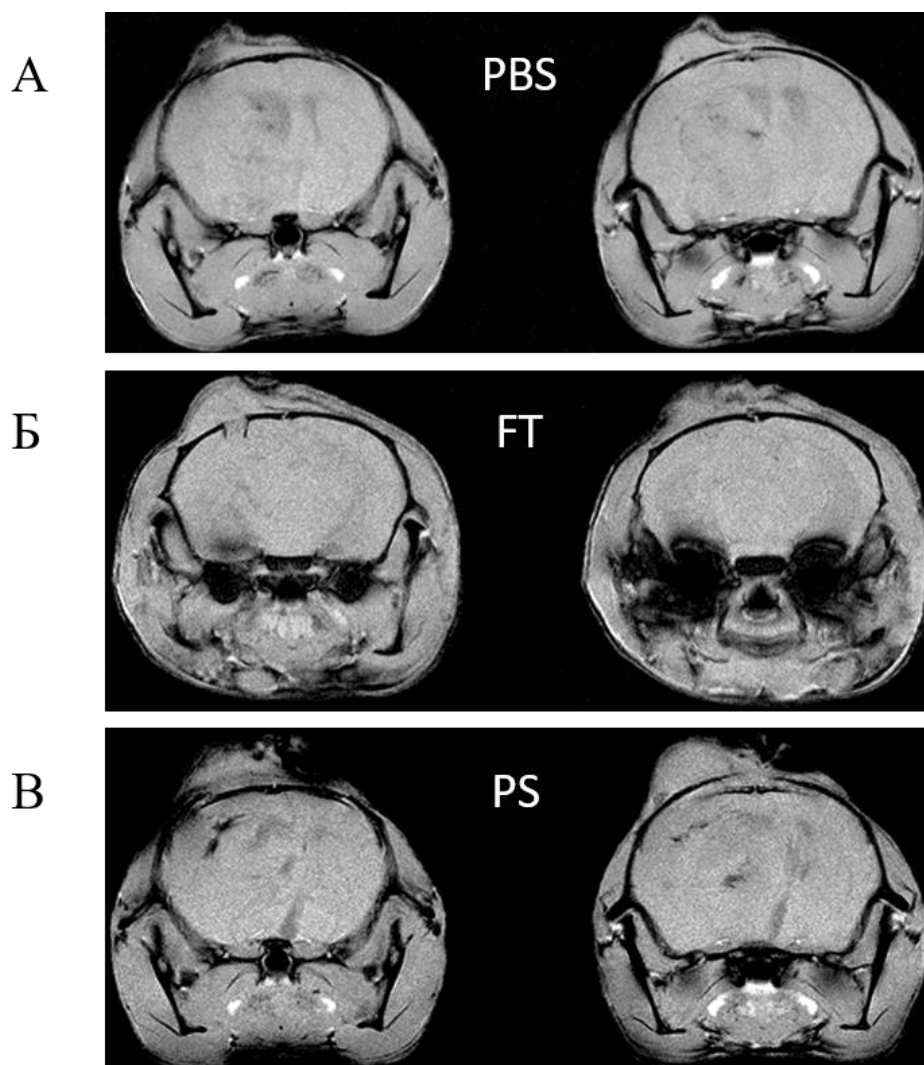


Рисунок 49. Репрезентативные томографическое изображение фронтальных срезов головного мозга мыши с развитым опухолевым очагом (11 день после инокуляции), перенесшей прививку умирающих фотоиндуцированных фотосенсом опухолевых клеток. **А** – неиммунизированная мышь; **Б** – животное, привитое дендритноклеточной вакциной на основе клеток, подвергшихся замораживанию/оттаиванию; **В** – вакцинированное животное дендритноклеточной вакциной на основе иммуногенно-погибающих клеток глиомы. TR=1000 мс, FOV – 20x20 мм, толщина среза – 1 мм

У животных, иммунизированных дендритной вакциной на основе некротически-убитых клеток глиомы, опухолевый очаг занимал $0,62 \pm 0,04 \text{ см}^3$,

располагался в первой и второй четверти правого полушария большого мозга, не имел четких границ. У животных, вакцинированных активированными дендритными клетками из группы «PS» (фотосенс), опухолевый очаг был наибольших размеров – $0,63 \pm 0,08 \text{ см}^3$ и имел наиболее размытые границы, глубоко проникающие книзу, при этом смещен к третьей четверти правого полушария большого мозга (рис. 49 В).

Через 7 дней, на 18 день после инокуляции глиомы GL261 в головной мозг, опухоли контрольных животных в 1,3 раза превысили объем опухолей иммунизированных животных из группы «PS» (фотосенс) и составил $1,04 \pm 0,55 \text{ см}^3$ (рис. 50). При этом у мышей из группы негативного неиммуногенного контроля (FT) опухоли развились до объема $1,34 \pm 0,55 \text{ см}^3$, сильно деформируя черепную коробку, углубляясь к обонятельному тракту, нарушая сосудистую сеть. Также наблюдалась обширная зона некроза в области брегмы (рис. 50 Б).

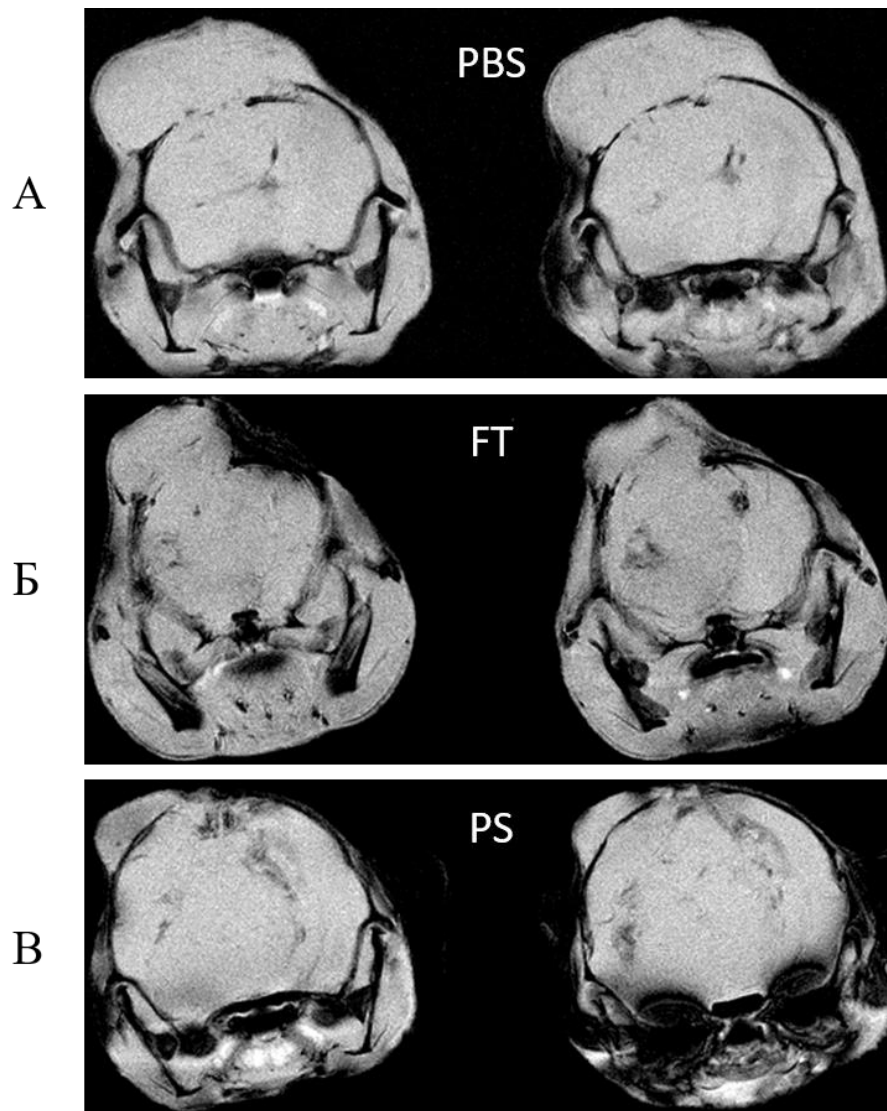


Рисунок 50. Репрезентативные томографическое изображение фронтальных срезов головного мозга мыши с развитым опухолевым очагом (18 день после инокуляции), перенесшей прививку умирающих фотоиндуцированных фотосенсом опухолевых клеток. **А** – неиммунизированная мышь; **Б** – животное, привитое дендритноклеточной вакциной на основе клеток, подвергшихся замораживанию/оттаиванию; **В** – вакцинированное животное дендритноклеточной вакциной на основе иммуногенно-погибающих клеток глиомы. TR=1000 мс, FOV – 20x20 мм, толщина среза – 1 мм

Объем опухоли у животного из группы иммунизированных мышей дендритной вакциной на основе фотоактивированных фотосенсом клеток был равен $0,78 \pm 0,05 \text{ см}^3$. Наблюдалось поражение сосудистой сети, деформация костей черепа, небольшая зона некроза вдоль продольной щели на уровне второй четверти полушарий большого мозга (рис. 50 В).

Для оценки динамики неврологических расстройств очаговый неврологический дефицит оценивали по шкале, где 15-20 баллов расценивается как выраженное повреждение, 8-14 баллов - умеренное повреждение и 1-7 баллов - как легкое (рис. 51).

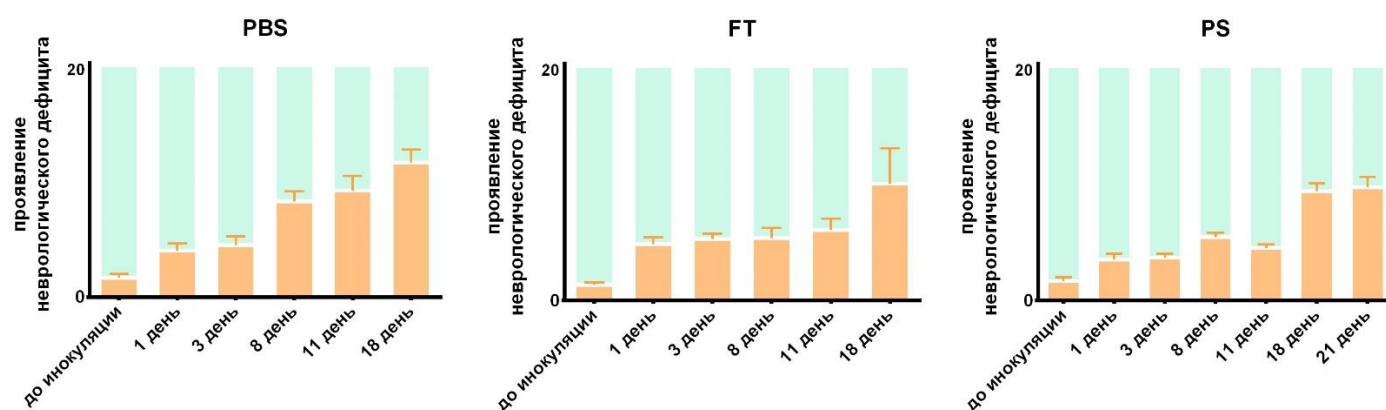


Рисунок 51. Неврологический статус мышей по шкале неврологического дефицита животных, иммунизированных дендритноклеточной вакциной на основе иммуногенно-погибающих клеток глиомы GL261 (PS). FT – применение дендритноклеточной вакцины на основе некротически-погибших клеток глиомы. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего по шкале от 0 до 20

Для всех групп животных до 9 дня после инокуляции наблюдалась легкая степень выраженности очаговой неврологической симптоматики. У мышей из группы контроля привития к 18 дню развивались умеренные и выраженной степени признаки, когда как у группы отрицательного контроля «FT» неврологический дефицит появлялся умеренно (рис. 51).

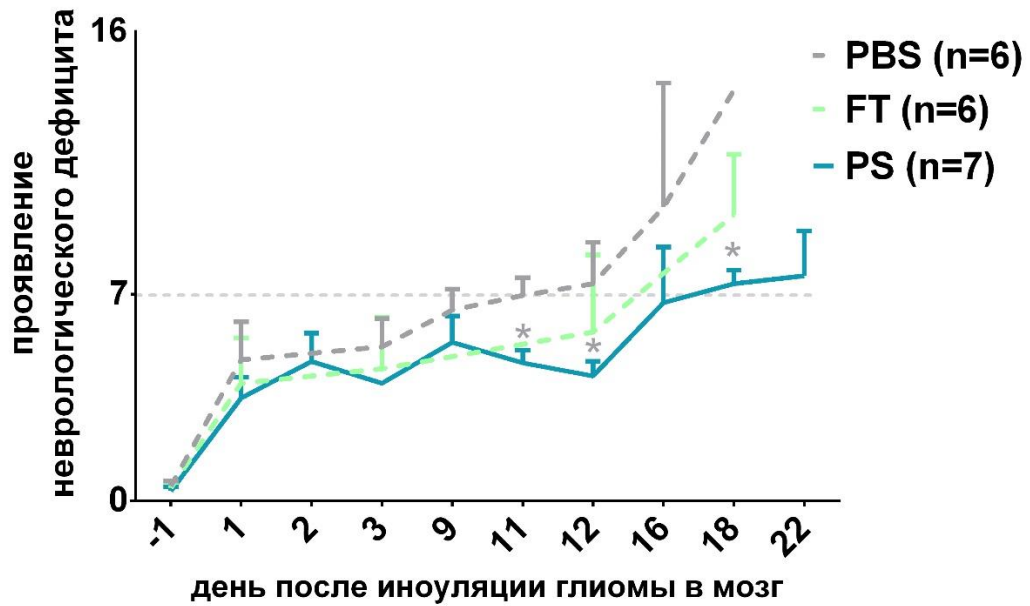


Рисунок 52. Изменение неврологического статуса мышей по шкале неврологического дефицита, вакцинированных дендритноклеточной вакциной на основе иммуногенно-погибающих клеток глиомы GL261 (PS) после иммунизации. FT – применение дендритноклеточной вакцины на основе некротически-погибших клеток глиомы. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,01$, статистически значимое отличие от группы PBS, критерий Уилкоксона

Значительная разница в неврологическом статусе иммунизированных животных зафиксирована на 18 день эксперимента по сравнению с группой контроля «PBS», при этом на 22 день у животных фиксировалась умеренная неврологическая симптоматика (рис. 52).

Таким образом, превентивная вакцинация от глиомы головного мозга с использованием дендритноклеточной вакцины на основе фотоактивированных фотосенсом клеток глиомы показала значительно большую выживаемость животных в эксперименте, меньшее проявление симптомов неврологического дефицита и вызывала развитие меньшего по объему опухолевого очага в сравнении с контрольными группами. Таким образом, это свидетельствует о иммуногенности гибели опухолевых клеток после фотодинамического воздействия и является

основой терапевтического протокола применения вакцины на основе дендритных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное исследование характеристик клеточной смерти опухолевых популяций вследствие фотодинамического воздействия с применением четырех фотоагентов: фотосенс, фотодитазин, порфиразин I и порфиразин III. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что все фотоагенты индуцируют иммуногенную клеточную гибель опухолевых клеток.

С целью анализа механизма регулируемой гибели опухолевых клеток выполнена оценка локализации, типа клеточной смерти и интенсивности высвобождения «сигналов опасности» DAMPs умирающими клетками (Kerr et al., 2014). Важное значение имеют химические свойства фотоагентов, определяющие их взаимодействие с клеточными органеллами и механизм клеточной гибели. Показана разница накопления фотосенсибилизаторов в клетках глиомы и фибросаркомы, что может быть связано с разной метаболической активностью клеток. Ранее сообщалось, что запуск механизмов регулируемой смерти в разных компартментах клетки приводит к разным типам клеточной смерти (Kessel et al., 2017). Важно отметить, что иммуногенную смерть вызывает не только стресс эндоплазматического ретикулума вследствие фотоповреждения, но и накопление фотоагентов в других компартментах (Gamrekelashvili, et al., 2012). Представление о том, что один фотосенсибилизатор может запускать более одного фенотипа клеточной смерти, перспективно, поскольку эта стратегия может быть полезной для преодоления часто наблюдаемой устойчивости раковых клеток к одному типу клеточной смерти (Casares et al., 2005; Obeid et al., 2007; Gamrekelashvili, et al., 2012). В работе показано, что накопление фотоагентов различной химической природы в аппарате Гольджи приводило к апоптотической гибели опухолевых клеток, тогда как локализация фотосенсибилизатора в лизосомах ассоциирована с гибелью по пути ферроптоза и некроптоза.

В результате количественной оценки высвобождения ключевых DAMPs с применением всех фотоагентов продемонстрировано 20-50 кратное увеличение концентрации сигнальных молекул во внеклеточной среде по сравнению с

необработанными клетками. На клетках глиомы и фибросаркомы с использованием фотосенса и фотодитазина обнаружен поверхностный кальретикулин - ранний маркер гибели, который является предшественником морфологических изменений в клетке. После индукции цитофлуорометрией зафиксирован достоверно повышенный уровень эктокальтеринулина даже в сравнении с положительным контролем – индукцией митоксантроном.

Иммуногенный потенциал клеточной смерти обусловлен способностью к активации антигенпрезентации. Молекулы, секретируемые умирающими клетками на поздних стадиях гибели, способны напрямую активировать дендритные клетки для привлечения Т-популяции в микросреду опухоли. Функциональная активация дендритных клеток связана с процессом созревания, характеризующимся повышенной экспрессией поверхностных молекул МНС I и II классов, костимулирующих молекул, приобретение хемокиновых рецепторов и усилением продукции и секреции цитокинов и хемокинов, которые контролируют дифференцировку и привлечение Т-клеток (Montico et al., 2018). В модели *in vitro* активации дендритных клеток показан результат взаимодействия с фотоиндуцированными клетками. Применение порфиразина I и для клеток глиомы, и для клеток фибросаркомы вызывало фенотипическое созревание антигенпрезентирующих клеток, что показано увеличением количества костимулирующих молекул на поверхности клеток, участвующих в процессе кросс-презентации. Для фибросаркомы, фотоиндуцированной фотосенсом и фотодитазином также характерен путь дифференцировки дендритных клеток, ассоциированный с привлечением и активацией Т-лимфоцитов в противоопухолевом ответе. Повышенная экспрессия МНСII показана при применении фотоиндукторов фотосенс, фотодитазин и порфиразин I, что говорит о способности дендритных клеток презентовать опухолевый антиген эффекторным Т-клеткам. В результате разные по своему действию фототоксические агенты, действующие на опухолевые клетки, вызывают созревание дендритных клеток, что может приводить к интенсивной иммунной противоопухолевой реакции. Помимо

этого, был детектирован высокий уровень высвобождаемого интерлейкина 6 дендритными клетками, взаимодействующими с умирающими фотоиндуцированными опухолевыми популяциями, являющегося важным в активации лимфоцитов в процессе антиген-презентации (Galluzzi et al., 2020).

Разработаны и успешно используются несколько моделей анализа иммуногенности терапии *in vivo*. В их число входит «золотой стандарт» профилактической вакцинации: раковые клетки мыши подвергаются действию потенциального индуктора иммуногенной клеточной смерти *in vitro*, а затем вводятся в качестве вакцины подкожно в отсутствие какого-либо иммунологического адъюванта (Humeau et al., 1884; Humeau et al., 2019). При этом прививаемая через 7-14 дней опухоль не развивается в случае эффективной активации адаптивной иммунной реакции (Humeau et al., 1884; Casares et al., 2005, Obeid et al., 2007; Love Aaes et al., 2016; Humeau et al., 2019; Efimova et al., 2020). *In vivo* раковые клетки, убитые фотодинамической терапией, защищают мышей от роста опухоли. Более того, эксперименты *in vivo* на иммунодефицитных мышах показали, что опухоли в группах применения вакцины на основе фотоиндуцированных клеток появлялись и развивались так же быстро, как и в группе контроля, получавшей PBS. Эти результаты показывают, что адаптивная иммунная система необходима для индукции противоопухолевой защиты *in vivo*.

Получены данные по иммунизации животных от привитой опухоли глиомы GL261 вакциной на основе умирающих фотоиндуцированных клеток. Показано, что введение суспензии фотоактивированных фотосенсом опухолевых клеток оказывало протективный эффект. Также использование привентивно дендритноклеточной вакцины на основе фотоиндуцированных клеток глиомы значительно увеличивало выживаемость животных, приводило к замедленному развитию опухолевого очага и улучшало неврологическое состояние животных в эксперименте. Таким образом показано, что фотосенсибилизатор фотосенс способен активировать иммуногенную клеточную смерть клеток глиомы, и такая

индукция гибели способна запускать противоопухолевые эффекты в моделях *in vivo*.

Представленные результаты позволяют охарактеризовать исследуемые фотоагенты как индукторы иммуногенной клеточной смерти опухолевых клеток. Эти фотосенсибилизаторы вызывают широко изученные характеристики ICD, такие как выброс двух важнейших DAMP: АТФ и HMGB1 и экспонирование кальретикулина на поверхности. Раковые клетки, убитые с применением фотодинамического воздействия в совокупности с использованием исследуемых фотоагентов, эффективно поглощаются, что приводит к фенотипическому созреванию и активации антигенпрезентирующих клеток. В экспериментах *in vivo* смоделирована превентивная вакцинация от опухоли, а также показана роль адаптивной системы в противоопухолевой защите.

ВЫВОДЫ

1. Локализация фотосенсибилизаторов (фотосенс, фотодитазин, порфиразин I и порфиразин III) в клетках глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205 ассоциируется с регулируемыми формами клеточной смерти вследствие фотодинамического воздействия;

2. Фотодинамическое воздействие с применением исследуемых фотосенсибилизаторов вызывает высвобождение ключевых DAMPs опухолевыми клетками, что свидетельствует о иммуногенном характере клеточной смерти;

3. Клетки глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205, индуцированные фотодинамической терапией с применением фотосенсибилизаторов фотосенс и фотодитазин, порфиразин I и порфиразин III, эффективно фагоцитируются антигенпрезентирующими клетками и обеспечивают их фенотипическое созревание;

4. Умиравшие опухолевые клетки, подверженные воздействию фотодинамической терапии с применением исследуемых фотоагентов, в модели профилактической противоопухолевой вакцинации защищают от образования и роста опухоли, активируя адаптивный противоопухолевый иммунитет.

Список сокращений

ASC - apoptosis-associated speck-like protein

ATP - adenosine triphosphate

BAK - BCL-2 homologous antagonist killer

BAX - BCL-2-associated X protein

Casp-1 – caspase-1

CD - cluster of differentiation

CRT - calreticulin

CTL - cytotoxic T lymphocyte

DAMPs - damage-associated molecular patterns

DCs - dendritic cells

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

ER - endoplasmic reticulum

FADD - FAS-associated protein with death domain

FCS - fetal calf serum

FT - freeze-thaw

GM-CSF - granulocyte/macrophage colony-stimulating factor

HMGB1 - high-mobility group box-1

HSP - heat-shock proteins

ICD - immunogenic cell death

IFN - interferon

IL – interleukin

LPS - lipopolysaccharide

mAb - monoclonal antibody

MAPK - mitogen-activated protein kinase

MDSC - myeloid-derived suppressor cell

MHC - major histocompatibility complex

MLKL - mixed-lineage kinase-like

MOMP - mitochondrial outer membrane permeabilization

NF- κ B - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NLRP3 - NLR family pyrin domain containing 3

NK cells - natural killer cells

PD-L1 - programmed death ligand

PRRs - pattern recognition receptors

PS - phosphatidyl serine

RCD - regulated cell death

RIPK1 - receptor-interacting serine/threonine protein kinase 1

RIPK3 - receptor-interacting serine/threonine protein kinase 3

ROS - reactive oxygen species

TAM - tumor-associated macrophage

TGF - transforming growth factor

TLR - Toll-like receptor

TNF - tumor necrosis factor

TRAIL - TNF-related apoptosis-inducing ligand

Tregs - regulatory T cells

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Балалаева И.В. Проточная цитофлуориметрия. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2014; 75.
2. Клапшина Л. Г. и др., Порфиразин, порфиразиновый комплекс гадолиния и их применение, Пат. № 0002621710, 07.06.2017
3. Лукьянец, Е.А. Поиск новых фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии / Е.А. Лукьянец // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2013. - №3. – Стр. 3-16.
4. Узденский, А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии / Узденский Анатолий Борисович – Санкт Петербург: Наука, 2010. – 323 с.
5. Черкасова Е.И., Брилкина А.А. Работа с культурами клеток // Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Издательство Нижегородского университета. 2015. 57 с.
6. Шилягина Н.Ю., Балалаева И.В., Турчин И.В., Шахова Н.М., Плеханов В.И., Брилкина А.А. Устройство для исследования световой активности фотосенсибилизаторов *in vitro*. Патент на полезную модель РФ № RU 150108.
7. Шилягина. Н.Ю. Диссертация на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02, 2014. Тема: «Исследование тетраарилтетрацианопорфиразинов в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики».
8. Aaes T.L., Kaczmarek A., Delvaeye T., De Craene B., De Koker S., Heyndrickx L., Delrue I., Taminau J., Wiernicki B., De Groote P., Garg A.D., Leybaert L., Grooten J., Bertrand M.J., Agostinis P., Berx G., Declercq W., Vandenabeele P., Krysko D.V. Vaccination with Necroptotic Cancer Cells Induces Efficient Anti-tumor Immunity // Cell Rep. 2016. V.15, N 2. P. 274-287.
9. Aaes T.L., Verschuere H., Kaczmarek A., Heyndrickx L., Wiernicki B., Delrue I., De Craene B., Taminau J., Delvaeye T., Bertrand M.J.M., Declercq W., Berx G., Krysko D.V., Adjemian S., Vandenabeele P. Immunodominant AH1 Antigen-

Deficient Necroptotic, but Not Apoptotic, Murine Cancer Cells Induce Antitumor Protection // *J Immunol.* 2020V. 204, N 4. P. 775-787.

10. Adkins I., Fucikova J., Garg A.D., Agostinis P., Špíšek R. Physical modalities inducing immunogenic tumor cell death for cancer immunotherapy // *Oncoimmunology.* 2015. V. 3, N 12. e968434.

11. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J.. Photodynamic therapy of cancer: an update // *CA Cancer J Clin.* 2011. V. 61, N 4. P. 250-281.

12. Albert M.L., Sauter B., Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs // *Nature.* 1998. V. 392, N 6671. P. 86-89.

13. Alzeibak R., Mishchenko T.A., Shilyagina N.Y., Balalaeva I.V., Vedunova M.V., Krysko D.V. Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future // *J Immunother Cancer.* 2021. V. 9, N 1. e001926.

14. Apetoh L., Ghiringhelli F., Tesniere A., Obeid M., Ortiz C., Criollo A., Mignot G., Maiuri M.C., Ullrich E., Saulnier P., Yang H., Amigorena S., Ryffel B., Barrat F.J., Saftig P., Levi F., Lidereau R., Nogues C., Mira J.P., Chompret A., Joulin V., Clavel-Chapelon F., Bourhis J., André F., Delaloge S., Tursz T., Kroemer G., Zitvogel L. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy // *Nat Med.* 2007. V. 13, N 9. P. 1050-1059.

15. Asadzadeh Z., Safarzadeh E., Safaei S., Baradaran A., Mohammadi A., Hajiasgharzadeh K., Derakhshani A., Argentiero A., Silvestris N., Baradaran B. Current Approaches for Combination Therapy of Cancer: The Role of Immunogenic Cell Death // *Cancers (Basel).* 2020. V. 12, N 4. P. 1047.

16. Azam F., Mehta S., Harris A.L. Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy // *Eur J Cancer.* 2010. V. 46, N 8. P. 1323-1332.

17. Barth R.J. Jr, Bock S.N., Mulé J.J., Rosenberg S.A. Unique murine tumor-associated antigens identified by tumor infiltrating lymphocytes // *J Immunol.* 1990. V. 144, N 4. P. 1531-1537.

18. Bebbber C.M., Müller F., Prieto Clemente L., Weber J., von Karstedt S. Ferroptosis in Cancer Cell Biology // *Cancers* (Basel). 2020. V. 12. N. 1. P. 164.
19. Berg K., Moan J.. Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer // *Photochem Photobiol.* 1997. V. 65, N 3. P. 403-409.
20. Berlanda J., Kiesslich T., Oberdanner C.B., Obermair F.J., Krammer B., Plaetzer K. Characterization of apoptosis induced by photodynamic treatment with hypericin in A431 human epidermoid carcinoma cells // *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2006. V. 25, N 1-2. P. 173-188.
21. Bianchi M.E., Agresti A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation // *Curr Opin Genet Dev.* 2005. V. 15, N 5. P. 496-506.
22. Boyle R.W., Dolphin D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers // *Photochem Photobiol.* 1996. V. 64, N 3. P. 469-485.
23. Brackett C.M., Gollnick S.O. Photodynamic therapy enhancement of anti-tumor immunity // *Photochem Photobiol Sci.* 2011. V. 10, N 5. P. 649-652.
24. Bugter J.M., Fenderico N., Maurice M.M. Mutations and mechanisms of WNT pathway tumour suppressors in cancer // *Nat Rev Cancer.* 2021. V. 21. P 5–21.
25. Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy // *Biochim Biophys Acta.* 2007. V. 1776, N 1. P. 86-107.
26. Caruso J.A., Mathieu P.A., Joiakim A., Leeson B., Kessel D., Sloane B.F., Reiners J.J. Jr. Differential susceptibilities of murine hepatoma 1c1c7 and Tao cells to the lysosomal photosensitizer NPe6: influence of aryl hydrocarbon receptor on lysosomal fragility and protease contents // *Mol Pharmacol.* 2004. V. 65, N 4. P. 1016-1028.
27. Casares N., Pequignot M.O., Tesniere A., Ghiringhelli F., Roux S., Chaput N., Schmitt E., Hamai A., Hervas-Stubbs S., Obeid M., Coutant F., Metivier D., Pichard E., Aucouturier P., Pierron G., Garrido C., Zitvogel L., Kroemer G. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death // *J. Exp. Med.* 2005. V. 202. P. 1691-1701

28. Chamoto K., Chowdhury P.S., Kumar A., Sonomura K., Matsuda F., Fagarasan S., Honjo T. Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017. V. 114, N 5. P. E761-E770.
29. Cózar B., Greppi M., Carpentier S., Narni-Mancinelli E., Chiossone L., Vivier E. Tumor-Infiltrating Natural Killer Cells // [published online ahead of print, 2020 Dec 4]. *Cancer Discov*. 2020. V. 10. P. 1158/2159-8290.
30. Curiel T.J., Coukos G., Zou L., Alvarez X., Cheng P., Mottram P., Evdemon-Hogan M., Conejo-Garcia J.R., Zhang L., Burow M., Zhu Y., Wei S., Kryczek I., Daniel B., Gordon A., Myers L., Lackner A., Disis M.L., Knutson K.L., Chen L., Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival // *Nat Med*. 2004. V. 10, N. 9. P. 942-949.
31. Degterev A., Huang Z., Boyce M., Li Y., Jagtap P., Mizushima N., Cuny G.D., Mitchison T.J., Moskowitz M.A., Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury // *Nat Chem Biol*. 2005. V. 1, N. 2. P. 112-9.
32. Demaria S., Bhardwaj N., McBride W.H., Formenti S.C. Combining radiotherapy and immunotherapy: a revived partnership // *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005. V. 63, N 3. P. 655-666.
33. Demuyunck R., Efimova I., Lin A., Declercq H., Krysko D.V. A 3D Cell Death Assay to Quantitatively Determine Ferroptosis in Spheroids // *Cells*. 2020.V. 9, N. 3. P. 703.
34. D'Herde K., Krysko D.V. Ferroptosis: Oxidized PEs trigger death // *Nat Chem Biol*. 2017. V. 13, N 1. P. 4-5
35. Dhuriya, Y.K., Sharma, D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death // *J Neuroinflammation*. 2018. V. 15. P. 199.
36. Dietze A., Selbo P.K., Prasmickaite L., Weyergang A., Bonsted A., Engesaeter B., Hogset A., Berg K. Photochemical internalization (PCI): a new modality for light activation of endocytosed therapeutics // *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2006. V. 25, N 1-2. P. 521-536.

37. Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R., Skouta R., Zaitsev E.M., Gleason C.E., Patel D.N., Bauer A.J., Cantley A.M., Yang W.S., Morrison B. 3rd, Stockwell B.R. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death // *Cell*. 2012. V. 149, N 5. P. 1060-1072.

38. Dodagatta-Marri E., Meyer D.S., Reeves M.Q., Paniagua R., To M.D., Binnewies M., Broz M.L., Mori H., Wu D., Adoumie M., Del Rosario R., Li O., Buchmann T., Liang B, Malato J., Arce Vargus F., Sheppard D., Hann B.C., Mirza A., Quezada S.A., Rosenblum M.D., Krummel M.F., Balmain A., Akhurst R.J. α -PD-1 therapy elevates Treg/Th balance and increases tumor cell pSmad3 that are both targeted by α -TGF β antibody to promote durable rejection and immunity in squamous cell carcinomas. // *J Immunother Cancer*. 2019. V. 7, N 1. P. 62.

39. Dondelinger Y., Declercq W., Montessuit S., Roelandt R., Goncalves A., Bruggeman I., Hulpiau P., Weber K., Sehon C.A., Marquis R.W., Bertin J., Gough P.J., Savvides S., Martinou J.C., Bertrand M.J., Vandenabeele P. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates // *Cell Rep*. 2014. V. 7, N. 4. P. 971-981.

40. Donohoe C., Senge M.O., Arnaut L.G., Gomes-da-Silva L.C. Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019. V. 1872, N 2. P. 188308.

41. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q. Photodynamic therapy // *J Natl Cancer Inst*. 1998. V. 90, N 12. P. 889-905.

42. Dudek A.M., Garg A.D., Krysko D.V., De Ruyscher D., Agostinis P. Inducers of immunogenic cancer cell death // *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013. V. 24. P. 319–333.

43. Dyck L., Mills K.H.G. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases // *Eur J Immunol*. 2017. V. 47, N 5. P. 765-779.

44. Efimova I., Catanzaro E., Van der Meeren L., Turubanova V.D., Hammad H., Mishchenko T.A., Vedunova M.V., Fimognari C., Bachert C., Coppieters F., Lefever

S., Skirtach A.G., Krysko O., Krysko D.V. Vaccination with early ferroptotic cancer cells induces efficient antitumor immunity // *J Immunother Cancer*. 2020. V. 8, N 2. e001369.

45. Egen J.G., Ouyang W., Wu L.C. Human Anti-tumor Immunity: Insights from Immunotherapy Clinical Trials // *Immunity*. 2020. V. 52, N. 1. P. 36-54.

46. Facciabene A., Peng X., Hagemann I.S., Balint K., Barchetti A., Wang L.P., Gimotty P.A., Gilks C.B., Lal P., Zhang L., Coukos G. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells // *Nature*. 2011. V. 475, N 7355. P. 226-230.

47. Ferri K.F., Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways // *Nat Cell Biol*. 2001. V. 3, N 11. P. E255-E263.

48. Gabrilovich D.I., Ostrand-Rosenberg S., Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours // *Nat Rev Immunol*. 2012. V. 12, N 4. P. 253-268.

49. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Demaria S., Formenti S.C., Kroemer G. Activating autophagy to potentiate immunogenic chemotherapy and radiation therapy // *Nat Rev Clin Oncol*. 2017. V. 14, N 4. P. 247-258.

50. Galluzzi L., Buqué A., Kepp O., Zitvogel L., Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease // *Nat Rev Immunol*. 2017. V. 17, N 2. P. 97-111.

51. Galluzzi L., Chan T.A., Kroemer G., Wolchok J.D., López-Soto A. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy // *Sci Transl Med*. 2018. V. 10, N 459. eaat7807.

52. Galluzzi L., Vitale I., Warren S., Adjemian S., Agostinis P., Martinez A.B., Chan T.A., Coukos G., Demaria S., Deutsch E., Draganov D., Edelson R.L., Formenti S.C., Fucikova J., Gabriele L., Gaipal U.S., Gameiro S.R., Garg A.D., Golden E., Han J., Harrington K.J., Hemminki A., Hodge J.W., Hossain D.M.S., Illidge T., Karin M., Kaufman H.L., Kepp O., Kroemer G., Lasarte J.J., Loi S., Lotze M.T., Manic G., Merghoub T., Melcher A.A., Mossman K.L., Prosper F., Rekdal Ø., Rescigno M., Riganti C., Sistigu A., Smyth M.J., Spisek R., Stagg J., Strauss B.E., Tang D., Tatsuno K., van Gool S.W., Vandenabeele P., Yamazaki T., Zamarin D., Zitvogel L., Cesano A., Marincola F.M. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of

immunogenic cell death // Journal for immunotherapy of cancer. 2020. V. 8, N 1. e000337.

53. Gamrekelashvili J., Ormandy L.A., Heimesaat M.M., Kirschning C.J., Manns M.P., Korangy F., Greten T.F. Primary sterile necrotic cells fail to cross-prime CD8(+) T cells // Oncoimmunology. 2012/ V. 1, N. 7. P. 1017-1026.

54. Garg A.D., Krysko D.V., Vandenabeele P., Agostinis P. DAMPs and PDT-mediated photo-oxidative stress: exploring the unknown // Photochem Photobiol Sci. 2011. V. 10, N 5. P. 670-680.

55. Garg A.D., Krysko D.V., Vandenabeele P., Agostinis P. Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin // Cancer Immunol Immunother. 2012. V. 61, N 2. P. 215-221.

56. Garg A.D., Krysko D.V., Vandenabeele P., Agostinis P. The emergence of phox-ER stress induced immunogenic apoptosis // Oncoimmunology. 2012. V. 1, N 5. P. 786-788.

57. Garg A.D., Krysko D.V., Verfaillie T., Kaczmarek A., Ferreira G.B., Marysaël T., Rubio N., Firczuk M., Mathieu C., Roebroek A.J., Annaert W., Golab J., de Witte P., Vandenabeele P., Agostinis P. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death // EMBO J. 2012. V. 31, N 5. P. 1062-1079.

58. Garg A.D., Nowis D., Golab J., Agostinis P. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity // Apoptosis. 2010. V. 15, N 9. P. 1050-1071.

59. Garg A.D., Vandenberk L., Koks C., Verschuere T., Boon L., Van Gool S.W., Agostinis P. Dendritic cell vaccines based on immunogenic cell death elicit danger signals and T cell-driven rejection of high-grade glioma // Sci Transl Med. 2016. V. 8, N 328. 328ra27.

60. Ghiringhelli F., Apetoh L., Tesniere A., Aymeric L., Ma Y., Ortiz C., Vermaelen K., Panaretakis T., Mignot G., Ullrich E., Perfettini J.L., Schlemmer F., Tasdemir E., Uhl M., Génin P., Civas A., Ryffel B., Kanellopoulos J., Tschopp J., André

F., Lidereau R., McLaughlin N.M., Haynes N.M., Smyth M.J., Kroemer G., Zitvogel L. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors // *Nat Med.* 2009. V. 15, N 10. P. 1170-1178.

61. Ghiringhelli F., Apetoh L., Tesniere A., Aymeric L., Ma Y., Ortiz C., Vermaelen K., Panaretakis T., Mignot G., Ullrich E., Perfettini J.L., Schlemmer F., Tasdemir E., Uhl M., Génin P., Civas A., Ryffel B., Kanellopoulos J., Tschopp J., André F., Lidereau R., McLaughlin N.M., Haynes N.M., Smyth M.J., Kroemer G., Zitvogel L. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors // *Nat Med.* 2009. V. 15, N. 10. P. 1170-8.

62. Golstein P., Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition // *Trends Biochem Sci.* 2007. V. 32, N 1. P. 37-43.

63. Gomes-da-Silva L.C., Zhao L., Bezu L., Zhou H., Sauvat A., Liu P., Durand S., Leduc M., Souquere S., Loos F., Mondragón L., Sveinbjörnsson B., Rekdal Ø., Boncompain G., Perez F., Arnaut L.G., Kepp O., Kroemer G. Photodynamic therapy with redaporfin targets the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus // *EMBO J.* 2018. V. 37, N 13. e98354.

64. Gong Y.N., Guy C., Olauson H., Becker J.U., Yang M., Fitzgerald P., Linkermann A., Green D.R. ESCRT-III Acts Downstream of MLKL to Regulate Necroptotic Cell Death and Its Consequences // *Cell.* 2017. V. 169, N 2. P. 286-300.e16.

65. Green D.R., Ferguson T., Zitvogel L., Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death // *Nat Rev Immunol.* 2009. V. 9, N 5. P. 353-363.

66. Grootjans S., Hassannia B., Delrue I., Goossens V., Wiernicki B., Dondelinger Y., Bertrand M.J., Krysko D.V., Vuylsteke M., Vandenabeele P., Vanden Berghe T. A real-time fluorometric method for the simultaneous detection of cell death type and rate // *Nat Protoc.* 2016. V. 11, N 8. P. 1444-1454.

67. Guo J., Xu B., Han Q., Zhou H., Xia Y., Gong C., Dai X., Li Z., Wu G. Ferroptosis: A Novel Anti-tumor Action for Cisplatin // *Cancer Res Treat.* 2018. V. 50, N 2. P. 445-460.

68. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell.* 2011 V. 144, N 5. P. 646-674.

69. Hanayama R., Tanaka M., Miyasaka K., Aozasa K., Koike M., Uchiyama Y., Nagata S. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice // *Science*. 2004. V. 304, N 5674. P. 1147-1150.
70. Humeau J., Lévesque S., Kroemer G., Pol J.G. Gold Standard Assessment of Immunogenic Cell Death in Oncological Mouse Models // *Methods Mol Biol*. 2019. V. 1884. P. 297-315.
71. Igney F.H., Krammer P.H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack // *J Leukoc Biol*. 2002. V. 71, N 6. P 907-920.
72. Izquierdo M.A., Vyšniauskas A., Lermontova S.A., Grigoryev I.S., Shilyagina N.Y., Balalaeva I.V., Klapshina L.G., Kuimova M.K. Dual use of porphyrazines as sensitizers and viscosity markers in photodynamic therapy // *J Mater Chem B*. 2015. V. 3, N 6. P. 1089-1096.
73. Jiang Q., Zhang C., Wang H., Peng T., Zhang L., Wang Y., Han W., Shi C. Mitochondria-Targeting Immunogenic Cell Death Inducer Improves the Adoptive T-Cell Therapy Against Solid Tumor // *Front Oncol*. 2019. V. 9. P. 1196.
74. Kagan V.E., Mao G., Qu F., Angeli J.P., Doll S., Croix C.S., Dar H.H., Liu B., Tyurin V.A., Ritov V.B., Kapralov A.A., Amoscato A.A., Jiang J., Anthonymuthu T., Mohammadyani D., Yang Q., Proneth B., Klein-Seetharaman J., Watkins S., Bahar I., Greenberger J., Mallampalli R.K., Stockwell B.R., Tyurina Y.Y., Conrad M., Bayır H. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis // *Nat Chem Biol*. 2017. V. 13, N 1. P. 81-90.
75. Kepp O., Galluzzi L., Zitvogel L., Kroemer G. Pyroptosis - a cell death modality of its kind? // *Eur J Immunol*. 2010. V. 40, N 3. P. 627-630.
76. Kepp O., Menger L., Vacchelli E., Locher C., Adjemian S., Yamazaki T., Martins I., Sukkurwala A.Q., Michaud M., Senovilla L., Galluzzi L., Kroemer G., Zitvogel L.. Crosstalk between ER stress and immunogenic cell death // *Cytokine Growth Factor Rev* 2013. V. 24, N 311. P. 8.
77. Kepp O., Senovilla L., Vitale I., Vacchelli E., Adjemian S., Agostinis P., Apetoh L., Aranda F., Barnaba V., Bloy N., Bracci L., Breckpot K., Brough D., Buqué A., Castro M.G., Cirone M., Colombo M.I., Cremer I., Demaria S., Dini L., Eliopoulos

A.G., Faggioni A., Formenti S.C., Fučíková J., Gabriele L., Gaipf U.S., Galon J., Garg A., Ghiringhelli F., Giese N.A., Guo Z.S., Hemminki A., Herrmann M., Hodge J.W., Holdenrieder S., Honeychurch J., Hu H.M., Huang X., Illidge T.M., Kono K., Korbelik M., Krysko D.V., Loi S., Lowenstein P.R., Lugli E., Ma Y., Madeo F., Manfredi A.A., Martins I., Mavilio D., Menger L., Merendino N., Michaud M., Mignot G., Mossman K.L., Multhoff G., Oehler R., Palombo F., Panaretakis T., Pol J., Proietti E., Ricci J.E., Riganti C., Rovere-Querini P., Rubartelli A., Sistigu A., Smyth M.J., Sonnemann J., Spisek R., Stagg J., Sukkurwala A.Q., Tartour E., Thorburn A., Thorne S.H., Vandenabeele P., Velotti F., Workenhe S.T., Yang H., Zong W.X., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death // *Oncoimmunology*. 2014. V. 3, N 9. e955691.

78. Kessel D. Pharmacokinetics of N-aspartyl chlorin e6 in cancer patients // *J Photochem Photobiol B*. 1997. V. 39, N 1. P. 81-83.

79. Kessel D. Subcellular Targeting as a Determinant of the Efficacy of Photodynamic Therapy // *Photochem Photobiol*. 2017. V. 93, N 2. P. 609-612.

80. Kessel D., Luo Y., Mathieu P., Reiners J.J. Jr. Determinants of the apoptotic response to lysosomal photodamage // *Photochem Photobiol*. 2000. V. 71, N 2. P. 196-200.

81. Kinzler K.W., Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers // *Nature*. 1997. V. 386, N 6627. P. 761-763.

82. Korbelik M. Cancer vaccines generated by photodynamic therapy // *Photochem Photobiol Sci*. 2011. V. 10, N 5. P. 664-669.

83. Korbelik M., Merchant S. Photodynamic therapy-generated cancer vaccine elicits acute phase and hormonal response in treated mice // *Cancer Immunol Immunother*. 2012. V. 61, N 9. P. 1387-1394.

84. Krasnovsky A.A Jr. Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies // *Membr Cell Biol*. 1998. V. 12, N 5. P. 665-690.

85. Kroemer G., Galluzzi L., Kepp O., Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy // *Annu Rev Immunol*. 2013. V. 31. P. 51-72.

86. Krysko D.V., Garg A.D., Kaczmarek A., Krysko O., Agostinis P., Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy // *Nat Rev Cancer*. 2012. V. 12, N 12. P. 860-875.
87. Krysko D.V., Vanden Berghe T., D'Herde K., Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis // *Methods*. 2008. V. 44, N 3. P. 205-221.
88. Krysko D.V., Vandenabeele P. Clearance of dead cells: mechanisms, immune responses and implication in the development of diseases // *Apoptosis*. 2010. V.15, N 9. P.995-997.
89. Krysko O., De Ridder L., Cornelissen M. Phosphatidylserine exposure during early primary necrosis (oncosis) in JB6 cells as evidenced by immunogold labeling technique // *Apoptosis*. 2004. V. 9, N 4. P. 495-500.
90. Krysko O., Løve Aaes T., Bachert C., Vandenabeele P., Krysko D.V. Many faces of DAMPs in cancer therapy // *Cell Death Dis*. 2013. V. 4, N 5. P. e631.
91. Kuimova M.K., Balaz M., Anderson H.L., Ogilby P.R. Intramolecular rotation in a porphyrin dimer controls singlet oxygen production // *J Am Chem Soc*. 2009. V. 131, N 23. P. 7948-7949.
92. Labani-Motlagh A., Ashja-Mahdavi M., Loskog A. The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses // *Front Immunol*. 2020. V. 11. P. 940.
93. Lamberti M.J., Nigro A., Mentucci F.M., Rumie Vittar N.B., Casolaro V., Dal Col J. Dendritic Cells and Immunogenic Cancer Cell Death: A Combination for Improving Antitumor Immunity // *Pharmaceutics*. 2020. V. 12, N 3. P. 256.
94. Lemmon M.A., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases // *Cell*. 2010. V. 141, N 7. P. 1117-1134.
95. Li W., Yang J., Luo L., Jiang M., Qin B., Yin H., Zhu C., Yuan X., Zhang J., Luo Z., Du Y., Li Q., Lou Y., Qiu Y., You J. Targeting photodynamic and photothermal therapy to the endoplasmic reticulum enhances immunogenic cancer cell death // *Nat Commun*. 2019. V. 10, N 1. P. 3349.

96. Li Z, Venegas V, Nagaoka Y, Morino E, Raghavan P, Audhya A, Nakanishi Y, Zhou Z. Necrotic Cells Actively Attract Phagocytes through the Collaborative Action of Two Distinct PS-Exposure Mechanisms // *PLoS Genet.* 2015. V. 11, N 6. P. 1005285.
97. Liu D., Chen B., Mo Y., Wang Z., Qi T., Zhang Q., Wang Y. Redox-Activated Porphyrin-Based Liposome Remote-Loaded with Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Inhibitor for Synergistic Photoimmunotherapy through Induction of Immunogenic Cell Death and Blockage of IDO Pathway // *Nano Lett.* 2019. V. 19, N 10. P. 6964-6976.
98. Liu P., Zhao L., Kepp O., Kroemer G. Quantitation of calreticulin exposure associated with immunogenic cell death // *Methods Enzymol.* 2020. V. 632. P.1-13.
99. Liu P., Zhao L., Loos F., Iribarren K., Lachkar S., Zhou H., Gomes-da-Silva L.C., Chen G., Bezu L., Boncompain G., Perez F., Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. Identification of pharmacological agents that induce HMGB1 release// *Sci Rep.* 2017. V. 7, N 1. P. 14915.
100. Martins I., Wang Y., Michaud M., Ma Y., Sukkurwala A. Q., Shen S., Kepp O., Métivier D., Galluzzi L., Perfettini J. L., Zitvogel L., Kroemer G. Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death // *Cell death and differentiation.* 2014. V. 21, N 1. P. 79–91.
101. Matroule J.Y., Carthy C.M., Granville D.J., Jolois O., Hunt D.W., Piette J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization // *Oncogene.* 2001/ V 20, N 30. P. 4070-4084.
102. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self // *Science.* 2002. V. 296, N 5566. P. 301-305.
103. Melero I., Gaudernack G., Gerritsen W., Huber C., Parmiani G., Scholl S., Thatcher N., Wagstaff J., Zielinski C., Faulkner I., Mellstedt H. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials // *Nat Rev Clin Oncol.* 2014. V. 11, N 9. P. 509-524.
104. Michaud M., Sukkurwala A.Q., Di Sano F., Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. Synthetic induction of immunogenic cell death by genetic stimulation of endoplasmic reticulum stress // *Oncoimmunology.* 2014. V. 3. P.e28276.

105. Miki Y., Akimoto J., Moritake K., Hironaka C., Fujiwara Y. Photodynamic therapy using talaporfin sodium induces concentration-dependent programmed necroptosis in human glioblastoma T98G cells // *Lasers Med Sci.* 2015. V. 30, N. 6. P. 1739-45.

106. Mishchenko T., Mitroshina E., Balalaeva I., Krysko O., Vedunova M., Krysko D.V. An emerging role for nanomaterials in increasing immunogenicity of cancer cell death // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2019. V. 1871, N 1. P. 99-108.

107. Mitra S., Giesselman B.R., De Jesús-Andino F.J., Foster T.H. Tumor response to mTHPC-mediated photodynamic therapy exhibits strong correlation with extracellular release of HSP70 // *Lasers Surg Med.* 2011. V. 43, N 7. P. 632-643.

108. Moan J., Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen // *Photochem Photobiol.* 1991. V. 53, N 4. P. 549-553.

109. Montico B., Nigro A., Casolaro V., Dal Col J. Immunogenic Apoptosis as a Novel Tool for Anticancer Vaccine Development // *Int J Mol Sci.* 2018. V.19, N 2. P. 594.

110. Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G.B., Hamblin M.R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer // *Cancers (Basel).* 2011. V. 3, N 2. P. 2516-2539.

111. Nowak A.K., Lake R.A., Marzo A.L., Scott B., Heath W.R., Collins E.J., Frelinger J.A., Robinson B.W. Induction of tumor cell apoptosis *in vivo* increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells // *J Immunol.* 2003. V. 170, N 10. P. 4905-4913.

112. Obeid M., Panaretakis T., Tesniere A., Joza N., Tufi R., Apetoh L., Ghiringhelli F., Zitvogel L., Kroemer G. Leveraging the immune system during chemotherapy: moving calreticulin to the cell surface converts apoptotic death from "silent" to immunogenic // *Cancer Res.* 2007. V. 67, N 17. P. 7941-7944.

113. Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F., Fimia G.M., Apetoh L., Perfettini J.L., Castedo M., Mignot G., Panaretakis T., Casares N., Métivier D., Larochette N., van

Endert P., Ciccocanti F., Piacentini M., Zitvogel L., Kroemer G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death // *Nat Med.* 2007. V. 13, N 1. P. 54-61.

114. Ormond A.B., Freeman H.S.. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy // *Materials (Basel)*. 2013. V. 6, N 3. P. 817-840.

115. Panaretakis T., Joza N., Modjtahedi N., Tesniere A., Vitale I., Durchschlag M., Fimia G.M., Kepp O., Piacentini M., Froehlich K.U., van Endert P., Zitvogel L., Madeo F., Kroemer G. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death // *Cell Death Differ.* 2008. V. 15, N 9. P. 1499-1509.

116. Panzarini E., Inguscio V., Fimia G.M., Dini L. Rose Bengal acetate photodynamic therapy (RBAC-PDT) induces exposure and release of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in human HeLa cells // *PLoS One*. 2014. V. 9, N 8. e105778.

117. Peng Q., Farrants G.W., Madslien K., Bommer J.C., Moan J., Danielsen H.E., Nesland J.M. Subcellular localization, redistribution and photobleaching of sulfonated aluminum phthalocyanines in a human melanoma cell line // *Int J Cancer*. 1991. V. 49, N 2. P. 290-295.

118. Peng T.I., Chang C.J, Guo M.J., Wang Y.H., Yu J.S., Wu H.Y., Jou M.J. Mitochondrion-targeted photosensitizer enhances the photodynamic effect-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis // *Ann N Y Acad Sci*. 2005. V. 1042. P. 419-428.

119. Piette J. Signalling pathway activation by photodynamic therapy: NF- κ B at the crossroad between oncology and immunology // *Photochem Photobiol Sci*. 2015. V. 14, N 8. P. 1510-1517.

120. Qualls M.M., Thompson D.H. Chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate delivered via acid-labile diplasmenylcholine-folate liposomes: intracellular localization and synergistic phototoxicity // *Int J Cancer*. 2001. V. 93, N 3. P. 384-392.

121. Razavi S.M., Lee K.E., Jin B.E., Aujla P.S., Gholamin S., Li G. Immune Evasion Strategies of Glioblastoma // *Front Surg*. 2016. V. 3, N 11.

122. Romanko Yu.S., Tsyb A.F., Kaplan M.A., Popuchiev V.V. Effect of photodynamic therapy with photodithazine on morphofunctional parameters of M-1

sarcoma // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2004. V. 138, N 6. P. 584–589.

123. Savill J., Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death // *Nature*. 2000. V. 407, N 6805. P. 784-788.

124. Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation // *Nature*. 2002. V. 18. P.191–195.

125. Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion // *Science*. 2011.V. 331, N 6024. P. 1565-1570.

126. Schumacher T.N., Schreiber R.D. Neoantigens in cancer immunotherapy // *Science*. 2015 V. 348, N 6230. P. 69-74.

127. Sehm T., Rauh M., Wiendieck K., Buchfelder M., Eyüpoglu I.Y., Savaskan N.E. Temozolomide toxicity operates in a xCT/SLC7a11 dependent manner and is fostered by ferroptosis // *Oncotarget*. 2016. V. 7, N 46. P. 74630-74647.

128. Showalter A., Limaye A., Oyer J.L., Igarashi R., Kittipatarin C., Copik A.J., Khaled A.R. Cytokines in immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy // *Cytokine*. 2017. V. 97. P. 123-132.

129. Solari J.I.G., Filippi-Chiela E., Pilar E.S., Nunes V., Gonzalez E.A., Figueiró F., Andrade C.F., Klamt F. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) related to immunogenic cell death are differentially triggered by clinically relevant chemotherapeutics in lung adenocarcinoma cells // *BMC Cancer*. 2020. V. 20, N. 1. P. 474.

130. Sukkurwala A.Q., Adjemian S., Senovilla L., Michaud M., Spaggiari S., Vacchelli E., Baracco E.E., Galluzzi L., Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. Screening of novel immunogenic cell death inducers within the NCI Mechanistic Diversity Set // *Oncoimmunology*. 2014.. V. 3. P. e28473.

131. Tang D., Kang R., Berghe T.V., Vandenabeele P., Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death // *Cell Res*. 2019. V. 29, N 5. P. 347-364.

132. Tesniere A., Panaretakis T., Kepp O., Apetoh L., Ghiringhelli F., Zitvogel L., Kroemer G. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death // *Cell Death Differ.* 2008. V. 15. P. 3–12.

133. Tesniere A., Schlemmer F., Boige V., Kepp O., Martins I., Ghiringhelli F., Aymeric L., Michaud M., Apetoh L., Barault L., Mendiboure J., Pignon J.P., Jooste V., van Endert P., Ducreux M., Zitvogel L., Piard F., Kroemer G. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin // *Oncogene.* 2010. V. 29, N 4. P. 482-491.

134. Topalian S.L., Taube J.M., Anders R.A., Pardoll D.M. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy // *Nat Rev Cancer.* 2016. V. 16, N 5. P. 275-287.

135. Tormoen G.W., Crittenden M.R., Gough M.J. Role of the immunosuppressive microenvironment in immunotherapy // *Adv Radiat Oncol.* 2018. V. 3, N. 4. P. 520-526.

136. Toscano M.A., Bianco G.A., Ilarregui J.M., Croci D.O., Correale J., Hernandez J.D., Zwirner N.W., Poirier F., Riley E.M., Baum L.G., Rabinovich G.A. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death // *Nat Immunol.* 2007. V. 8, N. 8. P. 825-834.

137. Uzdensky A.B., Ma L.W., Iani V., Hjortland G.O., Steen H.B., Moan J. Intracellular localisation of hypericin in human glioblastoma and carcinoma cell lines // *Lasers Med Sci.* 2001. V. 16, N 4. P. 276-283.

138. Vandenberk L., Garg A.D., Verschuere T., Koks C., Belmans J., Beullens M., Agostinis P., De Vleeschouwer S., Van Gool S.W. Irradiation of necrotic cancer cells, employed for pulsing dendritic cells (DCs), potentiates DC vaccine-induced antitumor immunity against high-grade glioma // *Oncoimmunology.* 2015. V. 5, N 2. e1083669.

139. Vonderheide R.H. The Immune Revolution: A Case for Priming, Not Checkpoint. *Cancer Cell.* 2018;33(4):563-569.

140. Wang D., DuBois R.N. The Role of Prostaglandin E(2) in Tumor-Associated Immunosuppression // *Trends Mol Med.* 2016. V. 22, N. 1. P. 1-3.

141. Wang H., Sun L., Su L., Rizo J., Liu L., Wang L.F., Wang F.S., Wang X. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3 // *Mol Cell*. 2014. V. 54, N. 1. P. 133-146.
142. Wang J.J., Lei K.F., Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018. V. 22, N 12. P. 3855-3864.
143. Wei S.C., Levine J.H., Cogdill A.P., Zhao Y., Anang N.A.S., Andrews M.C., Sharma P., Wang J., Wargo J.A., Pe'er D., Allison J.P. Distinct cellular mechanisms underlie anti-CTLA-4 and anti-PD-1 checkpoint blockade // *Cell*. V. 2017. V. 170. P. 1120–1133.e17.
144. Wettersten H.I., Ganti S., Weiss R.H. Metabolomic profiling of tumor-bearing mice // *Methods Enzymol*. 2014. V. 543. P. 275-296.
145. Witsch E., Sela M., Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression // *Physiology (Bethesda)*. 2010. V. 25, N 2. P. 85-101.
146. Wlodkowic D., Telford W., Skommer J., Darzynkiewicz Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death // *Methods Cell Biol*. 2011. V. 103. P. 55-98.
147. Yamaguchi Y., Kasukabe T., Kumakura S. Piperlongumine rapidly induces the death of human pancreatic cancer cells mainly through the induction of ferroptosis // *Int J Oncol*. 2018. V.52, N 3. P. 1011-1022.
148. Zappasodi R., Pupa S.M., Ghedini G.C., Bongarzone I., Magni M., Cabras A.D., Colombo M.P., Carlo-Stella C., Gianni A.M., Di Nicola M. Improved clinical outcome in indolent B-cell lymphoma patients vaccinated with autologous tumor cells experiencing immunogenic death // *Cancer Res*. 2010. V. 70.P. 9062–9072.
149. Zhang Y., Cheung Y.K., Ng D.K.P., Fong W.P. Immunogenic necroptosis in the anti-tumor photodynamic action of BAM-SiPc, a silicon(IV) phthalocyanine-based photosensitizer // *Cancer Immunol Immunother*. 2021. V. 70, N 2. P. 485-495.
150. Zheng B.Y., Shen X.M., Zhao D.M., Cai Y.B., Ke M.R., Huang J.D. Silicon(IV) phthalocyanines substituted axially with different nucleoside moieties.

Effects of nucleoside type on the photosensitizing efficiencies and *in vitro* photodynamic activities // J Photochem Photobiol B. 2016. V. 159. P. 196-204.

151. Zhou J., Wang G., Chen Y., Wang H., Hua Y., Cai Z.. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers // J Cell Mol Med. 2019. V. 23, N 8. P. 4854-4865.