

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО»

На правах рукописи

Цымбал Сергей Алексеевич

**МЕХАНИЗМЫ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ
КОМБИНИРОВАНИИ МЕДЬСОДЕРЖАЩИХ И ТИОЛОВЫХ
СОЕДИНЕНИЙ**

1.5.4 Биохимия

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор медицинских наук
Штиль Александр Альбертович

Санкт-Петербург - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность исследования.....	5
Степень разработанности темы диссертации.....	6
Цель диссертационного исследования.....	6
Научная новизна.....	7
Теоретическая и практическая значимость работы.....	7
Методология и методы исследования.....	8
Положения, выносимые на защиту	8
Степень достоверности и апробация результатов	9
Личный вклад автора	9
Структура и объём диссертации.....	9
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Молекулярные механизмы лекарственной устойчивости.....	10
1.1.1 Транспорт лекарств через плазматическую мембрану	11
1.1.2 Инактивация противоопухолевого соединения.....	13
1.1.3 Ингибирование апоптоза.....	14
1.1.4 Гетерогенность опухоли.....	15
1.1.5 Репарация ДНК.....	15
1.2 Механизмы гибели клеток.....	16
1.2.1 Апоптоз	16
1.2.2 Некроз.....	17
1.2.3 Некроптоз.....	19
1.2.4 Ферроптоз.....	19
1.2.5 Купроптоз.....	20
1.3 Активные формы кислорода в норме и патологии	21
1.3.1 Оксидативная терапия	23
1.4 Применение медьсодержащих соединений в противоопухолевой терапии.....	24
1.4.1 Биологические свойства меди.....	24
1.4.2 Препараты-модуляторы внутриклеточного перераспределения меди.....	26

1.4.3	Препараты на основе меди в терапии опухолевых заболеваний ...	27
1.4.4	Применение препаратов на основе меди в диагностике опухолевых заболеваний.....	29
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....		32
2.1	Источник наночастиц, солей и органических комплексов меди	32
2.2	Культивирование клеточных линий	32
2.3	Анализ цитотоксичности	33
2.4	Проточная цитофлуориметрия	33
2.4.1	Кинетика гибели клеток	33
2.4.2	Детекция АФК	34
2.4.3	Окрашивание Аннексин V-FITC/PI.....	34
2.4.4	Распределение фаз клеточного цикла	34
2.4.5	Трансмембранный потенциал митохондрий	34
2.4.6	Иммуноокрашивание	35
2.5	Конфокальная микроскопия	35
2.6	Иммуноблоттинг	36
2.7	Атомно-абсорбционная спектроскопия.	37
2.8	Эксперименты с искусственными мембранами	37
2.8.1	Формирование плоских бислоев и регистрация токов, протекающих через мембраны.....	37
2.8.2	Флуориметрия утечки кальцеина из липосом.....	37
2.8.3	Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия липосом .	38
2.9	Исследование противоопухолевой активности комбинации наночастиц CuO и N-ацетилцистеина на модели асцитной опухоли Эрлиха у мышей BALB/c	39
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ		41
3.1	Получение медьсодержащих соединений.....	41
3.2	Цитотоксичность наночастиц CuO значительно повышается в присутствии N-ацетилцистеина	44
3.3	Исследование специфичности реакции между CuO и NAC	48
3.4	Исследование параметров клеточной гибели	51
3.4.1	Определение времени гибели	51
3.4.2	Клеточная гибель провоцируется окислительным стрессом.....	53

3.4.3 Комбинация наночастиц CuO и NAC способствует изменению активности митохондрий.....	54
3.4.4 Обнаружение признаков апоптотической гибели	57
3.4.5 Комбинация способна влиять на клеточный цикл клеток MDA-MB-231 и HCT116	58
3.4.6 Комбинация НЧ CuO и N-ацетилцистеина не вызывает активацию классических апоптотических путей или некроптоза	62
3.5 Наночастицы CuO обладают низкой способностью проникать внутрь клетки	67
3.6 Комбинация НЧ CuO и NAC изменяет проницаемость искусственных фосфолипидных мембран	69
3.6.1 Измерение утечки флуоресцентного красителя из больших везикул в присутствии NAC и наночастиц из CuO	71
3.6.2 Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия в присутствии NAC и наночастиц из CuO	72
3.7 Взаимодействие медьорганических комплексов с NAC	75
3.8 Выявление химической природы взаимодействия между медьсодержащими соединениями и N-ацетилцистеином	81
3.9 Исследование противоопухолевой активности комбинации in vivo ...	85
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	101
ВЫВОДЫ	104
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	106

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Формирование лекарственной устойчивости – одна из важнейших проблем при химиотерапии опухолей. Различные механизмы позволяют злокачественным клеткам не только избегать действия химиопрепаратов, но и давать начало рецидиву, ухудшая результаты лечения и прогноз для пациентов. В настоящее время доступно множество подходов борьбы с устойчивостью, например, модификация структуры лекарственного средства, комбинированная терапия с использованием нескольких препаратов, адресная доставка наночастицами, однако проблема остается нерешенной, что во многих случаях связано с блокированием механизмов апоптоза.

Оксидативная терапия использует активные формы кислорода (АФК) для элиминации опухолевых клеток. Такое воздействие способно запускать механизмы регулируемой клеточной гибели отличные от апоптоза и оказывает негативное влияние в том числе на опухолевую нишу, снижая способность опухоль-ассоциированных фибробластов поддерживать жизнеспособность опухоли. При терминальной стадии заболевания и в условиях сформированной лекарственной устойчивости, именно оксидативная терапия может дать положительный результат, так как раковые и ассоциированные с ними клетки имеют ряд черт, обуславливающих их восприимчивость к такому воздействию.

АФК могут продуцироваться довольно широким спектром соединений, включая медьсодержащие. Органические комплексы и наночастицы (НЧ) на основе меди рассматриваются как перспективные противоопухолевые препараты, сравнимые с соединениями цисплатинового ряда. Цитотоксичность меди может модулироваться различными органическими молекулами, такими как антиоксиданты, но эти взаимодействия недостаточно изучены. Витамин Е снижает медь-опосредованную токсичность, в то время как витамин С может выступать в роли прооксиданта или антиоксиданта в зависимости от концентрации. Взаимодействие меди и гомоцистеина приводит к увеличению внутриклеточного уровня перекиси водорода и развитию нейротоксичности.

Zheng J. et al. (2010) показали, что комбинация хлорида меди (II) и N-ацетилцистеина вызывает значительный цитотоксический эффект для различных культур опухолевых клеток, что связано с повышенным образованием перекиси водорода. В то же время имеются данные о протекторной роли N-ацетилцистеина при медь индуцированной нейротоксичности. Таким образом, результат взаимодействия соединений остаётся неясен.

Данная работа направлена на установление механизмов усиления цитотоксичности медьсодержащих соединений в присутствии органических восстановителей для индукции гибели опухолевых клеток – родительских и изогенных сублиний с лекарственной устойчивостью.

Степень разработанности темы диссертации

Проведены исследования по индукции гибели опухолевых клеток человека и мыши, а также изменения их метаболической активности при действии наночастиц оксида меди или медьорганических комплексов в присутствии органических восстановителей – N-ацетилцистеина и аскорбата. Выявлено уникальное свойство меди (II) восстанавливаться в этих условиях, что приводит к продукции АФК с последующим повреждением макромолекул плазматической и других мембран, и быстрой гибели клеток. Такое воздействие оказывается эффективным в случае блокирования апоптотических каскадов и других механизмов ответа на стрессовые воздействия – феноменов, характерных для клеток с лекарственной резистентностью.

Основное внимание уделено изучению молекулярно-биологических и биохимических особенностей гибели клеток при восстановлении двухвалентной меди до одновалентной. С практических позиций важно установление противоопухолевой эффективности комбинации медьсодержащих соединений и восстановителя в модели трансплантированной опухоли.

Цель диссертационного исследования

Цель исследования – установить биохимические механизмы цитотоксичности комбинаций медьсодержащих соединений и восстановителей

(N-ацетилцистеин, аскорбат) для опухолевых клеток человека и трансплантированной опухоли у лабораторных мышей.

Задачи исследования:

1. Определить диапазоны концентраций медьсодержащих соединений, восстановителей и их комбинаций для индукции гибели культивируемых клеток.
2. Выявить механизмы взаимодействия меди (II) с N-ацетилцистеином в бесклеточной системе.
3. Установить биохимические механизмы гибели клеток при действии комбинации наночастиц оксида меди и медьорганических комплексов с восстановителями.
4. Подтвердить противоопухолевую эффективность комбинации медьорганического комплекса и N-ацетилцистеина на модели трансплантированной опухоли у мышей.

Научная новизна

Впервые показано, что эффект взаимодействия с восстановителями специфичен для соединений меди (II) в разных контекстах: наночастицы CuO, растворимая соль или металлоорганический комплекс. Помимо соединений, содержащих тиольную группу, восстанавливать двухвалентную медь способны и другие агенты, например, аскорбиновая кислота. Другие переходные металлы не взаимодействуют с указанными восстановителями.

Впервые показано протекание гибели клеток без активации классических механизмов апоптоза, что расширяет терапевтический потенциал комбинаций.

Впервые показана возможность снижения опухолевой нагрузки у лабораторных мышей-опухоленосителей при введении комбинации медьорганического соединения и восстановителя.

Теоретическая и практическая значимость работы

Общебиологическая значимость работы заключается в установлении механизма повышения цитотоксичности медьсодержащих соединений (наночастиц и органических комплексов) в комбинации с органическими восстановителями, в т.ч. физиологическими (цистеин, аскорбат). Генерируемый

комбинацией окислительный “взрыв” приводит к гибели родительских и резистентных клеток без активации апоптоза. Такой результат имеет практическое значение для разработки рациональной высокоэффективной стратегий борьбы с лекарственной устойчивостью опухолей, в особенности при терминальной фазе заболевания, когда возможности апоптогенной терапии исчерпаны.

Методология и методы исследования

Основная часть работы выполнена с использованием культур опухолевых клеток человека: линии хронического миелоидного лейкоза K562, аденокарциномы кишки HCT116 и тройного негативного рака молочной железы MDA-MB-231. Также использованы сублинии с признаками лекарственной устойчивости: K562/4 (повышенная экспрессия Р-гликопротеина, множественная лекарственная устойчивость) и HCT116TP53^{-/-} (сниженная чувствительность к повреждениям ДНК). Для характеристики клеточной гибели и молекулярно-биологических механизмов её реализации применялись колориметрический МТТ-тест, конфокальная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, иммуноблоттинг, атомно-адсорбционная спектроскопия. Эксперименты в бесклеточных системах включали работу с искусственными мембранами, определение SH-групп методом Элмана, циклическую вольтамперометрию. Противоопухолевая эффективность изучена на мышах-самках Balb/c с трансплантированной асцитной опухолью Эрлиха. Первичные результаты обработаны современными статистическими методами.

Положения, выносимые на защиту

1. Добавление N-ацетилцистеина приводит к многократному усилению цитотоксичности различных медьсодержащих веществ (наночастиц, солей и органических комплексов), но не других переходных металлов.
2. Гибель клеток обусловлена повреждением плазматической мембраны за счёт генерации АФК в первые часы действия комбинации без индукции апоптотических каскадов.

3. Восстановление меди лежит в основе генерации АФК за счёт её участия в реакциях Габера-Вейса и Фентона.

4. На лабораторных животных (мыши Balb/c) с трансплантированной опухолью Эрлиха выявлено торможение роста асцита при комбинировании медьорганического комплекса и N-ацетилцистеина сравнимое с конвенциональным препаратом цисплатином.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты исследований, представленные в работе, получены на современном оборудовании, с использованием общепринятых биологических моделей и протоколов. Достоверность полученных результатов подтверждается первичными данными, а также их статистической обработкой.

Материалы диссертационной работы были опубликованы в виде 3 статей в рецензируемых международных журналах и представлены в виде докладов на 15 конференциях всероссийского и международного уровня. Результаты исследования были также оформлены в виде патента на изобретение № 2721771 «Применение композиции наночастиц оксида меди и N-ацетилцистеина для индукции гибели клеток хронического миелоидного лейкоза», Роспатент.

Личный вклад автора

Вклад автора заключался в планировании и проведении всех экспериментов на клеточных культурах, а также в непосредственном участии в проведении экспериментов на животных. Им также проводилась статистическая обработка и анализ экспериментальных данных, а также их представление в виде публикаций и докладов на конференциях. Перед публикацией все результаты и материалы работы предварительно обсуждались с научным руководителем и соавторами.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав с описанием исследований (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования и обсуждение), заключения, выводов и списка литературы. Текст работы изложен на 125 страницах, включает 42 изображения и 6 таблиц. Список литературы содержит 168 источников.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Молекулярные механизмы лекарственной устойчивости

На протяжении многих десятилетий борьба с лекарственной устойчивостью остается одной из основных задач химиотерапии опухолевых заболеваний. Этот феномен проявляется, когда химиотерапевтическое средство, ранее использовавшееся для терапии опухоли, становится не эффективным и никак не влияет на рост и пролиферацию опухолевых клеток. Различные механизмы позволяют злокачественным клеткам избегать терапевтического действия препаратов, что приводит к рецидиву и ухудшению прогноза для пациента. Существует множество подходов противодействия лекарственной устойчивости, основанных на использовании структурно модифицированных лекарств или комбинаций препаратов для одновременного воздействия на несколько мишеней [1], [2]. Тем не менее удовлетворительного прогресса в терапии не наблюдается из-за неоднородности популяции опухолевых клеток, активации пролиферации, экспрессии специфичных транспортеров и угнетения механизмов апоптоза [3]. Помимо этого, большое влияние на устойчивость имеют ассоциированные с опухолью фибробласты и иммунные клетки, обеспечивающие нишу для роста и размножения опухолевых клеток [4]. При разнородности молекулярных механизмов устойчивости тяжело подобрать воздействие, которое было бы эффективным в каждом случае, в особенности учитывая частую невозможность индукции апоптоза.

Этот феномен проявляется на различных этапах лечения: опухоль может быть изначально резистентной к определённым химиотерапевтическим воздействиям, либо же вырабатывать эту резистентность в результате продолжительной терапии. Молекулярные механизмы лекарственной устойчивости, которые проявляются у опухолевых клеток, довольно вариативны (Рисунок 1)[5]. Несмотря на то, что формирование резистентности к препаратам является стохастическим процессом и в большой степени зависит от скорости накопления мутаций, в настоящее время до 90% неудач химиотерапии на поздних

стадиях заболевания возникают из-за появления клеток, не отвечающих на существующие протоколы лечения, поэтому критически важно принимать этот факт во внимание до и во время лечения [6].

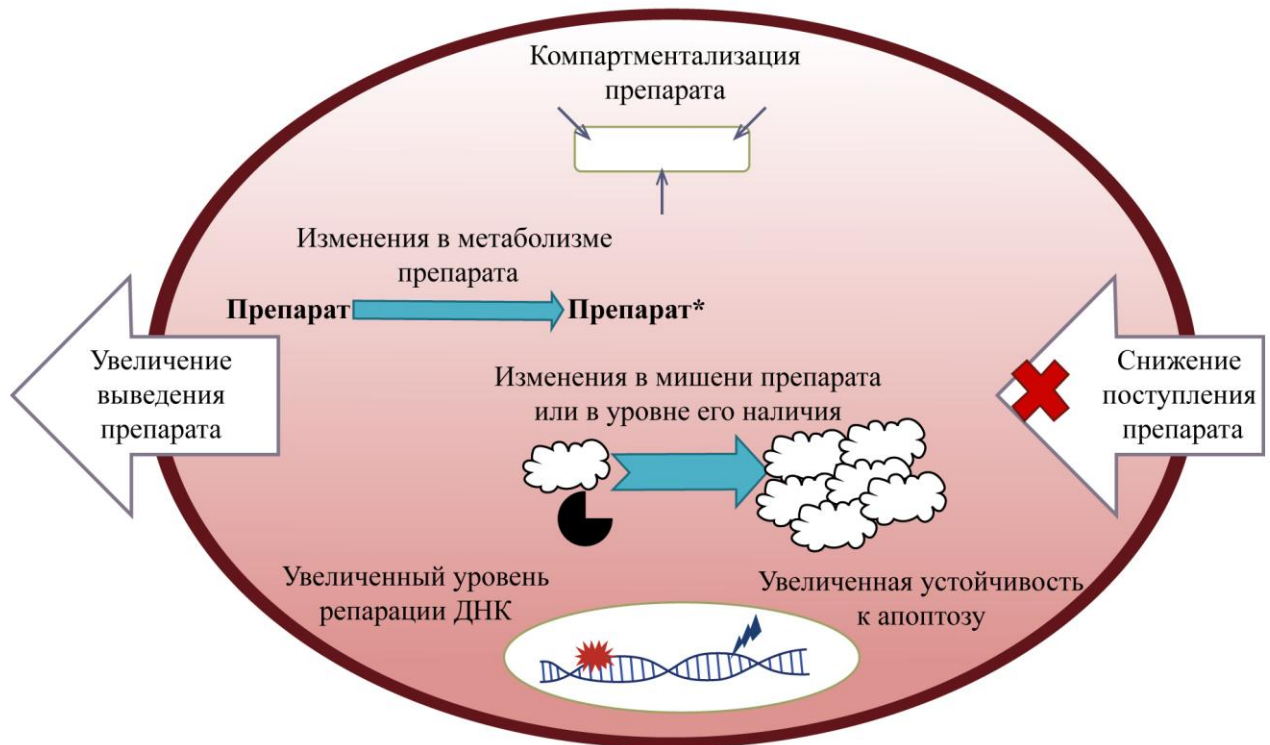


Рисунок 1. Механизмы лекарственной устойчивости раковых клеток (адаптировано и переведено из [3])

Ниже приводится детальное описание основных молекулярных механизмов устойчивости, наблюдаемых в клинике.

1.1.1 Транспорт лекарств через плазматическую мембрану

Для создания анти-пролиферативного эффекта противоопухолевый препарат должен присутствовать в клетке в определённой концентрации. Если концентрация препарата недостаточна, опухолевые клетки будут либо продолжать делиться, но с меньшей скоростью, либо «замрут», то есть прекратят деление, в ожидании снижения терапевтической нагрузки. Баланс поступления препарата в клетку и его транспорта из клетки определяет его внутриклеточную концентрацию, а значит и терапевтический эффект.

Всасывание лекарств в опухоль зависит от многих параметров. Прежде всего сказывается её местоположение. Например, если опухоль находится за гематоэнцефалическим барьером, то не все лекарства смогут до неё добраться [7]. Также количество препарата, абсорбированного опухолью, будет зависеть от её васкуляризации и выраженности некротической гибели, которая может повлиять на проницаемость сосудов [8]. Так как многие лекарства входят в клетку путем пассивной диффузии по градиенту концентрации, состав плазматической мембраны может также влиять на противоопухолевую активность препарата [9]. Внутриклеточный pH может изменять уровень накопления препарата в клетках в зависимости от значения его собственной кислотности [10]. Наконец, некоторые препараты поступают в клетку активно за счёт транспортеров, например, молекулы метотрексата захватываются и переносятся в цитоплазму фолатным переносчиком hRFC. При остром лимфобластном лейкозе может развиваться резистентность к метотрексату при мутации гена этого переносчика, приводящей к замене лизина на глутаминовую кислоту в сайте связывания [11, 12].

Транспорт противоопухолевого препарата из клетки обычно происходит активно, через специальные транспортные молекулы, которые носят название АТФ-связывающие кассетные транспортеры (ATP-binding cassette transporter, ABC). Это семейство представлено тремя основными белками: 1) Р-гликопротеин (PGP) [13]; 2) белок 1, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью (MRP1) [14] и 3) белок устойчивости к раку молочной железы (BCRP) [15]. Р-гликопротеин, продукт гена *MDR1*, выводит из клетки физиологические соединения и ксенобиотики. Среди последних – химиотерапевтические агенты винка-алкалоиды (винбластин, винкристин), таксаны, ингибиторы топоизомераз (этопозид), антрациклины (прототип – доксорубин) [10]. Помимо Р-гликопротеина, обладающего высоким сродством к гидрофобным молекулам, раковые клетки могут сверхэкспрессировать другие различные ABC-транспортеры [6]. Например, при раке легкого гиперэкспрессия *MDR1* является относительно редким случаем, однако было обнаружено, что *MRP1* функционирует как основной транспортер противоопухолевых препаратов.

Продукт этого гена обладает высоким сродством к отрицательно заряженным молекулам, особенно к молекулам, модифицированным глутатионом, глюкуронилированием, сульфатированием, или гликозилированием [16, 17]. Модификация молекулы препарата внутриклеточными ферментами является довольно частым механизмом, вовлечённым в формирование резистентности (см. ниже).

Таким образом, есть три основных пути, обеспечивающие прекращение поступления лекарства внутрь клетки: 1) мутация в транспортёре, препятствующая соответствующему взаимодействию; 2) уменьшение количества молекул-транспортёров, ответственных за импорт препарат в клетку; 3) гиперэкспрессия экспортёров и усиление транспорта препаратов из клетки.

1.1.2 Инактивация противоопухолевого соединения

Химическая модификация молекулы лекарственного средства может иметь как положительный, так и отрицательный эффект. Например, цитарабин, который используется для лечения острого миелоидного лейкоза, неэффективен в нативной форме; вместо этого он должен фосфорилироваться внутриклеточными ферментами, чтобы стать цитотоксичным для раковых клеток [18]. Другое лекарственное вещество, циклофосфамид, которое часто используется для лечения лимфом, лейкозий и нейробластом, также должно быть активировано в печени цитохромом P450 в активный метаболит [19].

В то же время, широкий спектр ферментов, которые способны модифицировать молекулы лекарственных препаратов, участвуют не в их активации, а напротив делают препарат неспособным выполнять свои функции. К химическим модификациям препаратов, которые способствуют их инактивации, относятся глютационилирование (присоединение глутатиона к молекуле препарата) и глюкуронирование (присоединение остатка сахара). Белки семейства глутатион-S-трансфераз известны как основные белки детоксикации внутри клетки [20, 21]. Они катализируют присоединение молекулы глутатиона к субстрату, повышая его водорастворимость и способствуя дальнейшему

расщеплению. Гиперэкспрессия этих белков приводит к усилению устойчивости к различным химическим агентам [22].

Уридин-5'-дифосфоглюкуронозилтрансфераза (УГТ или UGT) катализирует глюкуронилирование (см. выше). Конечным продуктом реакции являются неактивные глюкурониды с молекулой субстрата – желчной кислотой, стероидными гормонами или ксенобиотиками. У человека гены семейства *UGT* контролируются метилированием соответствующих промоторов и репрессированы при некоторых опухолях [23]. Однако эпигенетические перестройки могут способствовать гиперэкспрессии *UGT* и формированию лекарственной устойчивости [24]. Модификация молекулы препарата способствует его включению в естественный метаболизм клетки, расщеплению и окончательной детоксикации.

1.1.3 Ингибирование апоптоза

Одной из ключевых отличительных черт опухолевых клеток является их способность ингибировать механизмы апоптоза и таким образом продолжать пролиферацию. Данная способность очень важна для развития опухолей, так как позволяет клеткам делиться и не умирать даже несмотря на наличие и накопление мутаций. Ингибирование апоптоза реализуется двумя способами: за счет повышенной экспрессии антиапоптотических генов, таких как *BCL2*, *AKT* и т. д., или снижения экспрессии проапоптотических, таких как *BAX* или *BID* [25]. Ослабление индукции апоптоза играет существенную роль и в становлении лекарственной устойчивости опухолевых клеток [26]. Кроме того, мутации в гене *TP53* способствуют не только возникновению рака, но и способствуют формированию лекарственной устойчивости существующей опухоли [25]. Эти мутации могут дополнительно нарушать активацию апоптоза после предшествующего повреждения ДНК химиотерапевтическими препаратами.

Ингибирование апоптоза является серьёзным препятствием для эффективной химиотерапии опухолей, поэтому было предложено несколько способов, чтобы обойти его. Один из таких подходов основан на ингибировании сверхэкспрессированных антиапоптотических факторов. Ингибиторы семейства

BCL-2, ингибиторы протеаз и ингибиторы киназ, ингибиторы гистондеацетилазы (HDACi) демонстрируют противораковую активность в лабораторных исследованиях [27, 28]. Ингибирование NF-κB и STAT, нижестоящих регуляторов транскрипции, высокоактивных в опухоли, также показывает многообещающий эффект в терапии рака [29].

1.1.4 Гетерогенность опухоли

Популяция опухолевых клеток часто состоит из клеточных субпопуляций с различными геномными и фенотипическими характеристиками. Эти различия являются результатом нестабильности генома, которая вызывает высокую скорость мутаций, хромосомные перестройки, aberrантную экспрессию генов. Кроме того, эпигенетические факторы также могут приводить к разнообразию популяции раковых клеток [30]. Помимо этих внутренних причин существует множество внеклеточных факторов, которые создают гетерогенность опухоли, таких как гипоксия, рН или паракринные взаимодействия с окружающими клетками [31]. В предыдущем исследовании острого миелоидного лейкоза в опухолевой популяции было выявлено два доминантных клона, существующих одновременно, причем один из клонов был чувствителен к лекарству, а другой – устойчив к нему. Не исключено, что рецидив этого заболевания у больных после успешной химиотерапии мог быть результатом роста клеток из лекарственно-резистентного предшественника [32].

Наиболее известной субпопуляцией опухолевых клеток являются опухолевые стволовые клетки (ОСК), которые обладают рядом сходных свойств с нормальными стволовыми клетками: долгая жизнь, устойчивость к лекарствам и токсинам, активная репарация ДНК и устойчивость к апоптозу, сосудистая ниша, покой и гипоксическая стабильность [5, 33]. Эти особенности позволяют раковым клеткам оставаться стабильными в организме больного или метастазировать в отдаленные органы и вызывать рецидив заболевания. Таким образом, выявление и устранение ОСК является стратегией предотвращения распространения и выживания рака, а также устранения лекарственной устойчивости.

1.1.5 Репарация ДНК

Репарация ДНК является одним из хорошо изученных и охарактеризованных механизмов лекарственной устойчивости. Химиотерапевтические агенты часто прямо или косвенно повреждают ДНК опухолевых клеток, поэтому для её восстановления активируется специальная система репарации. Например, препараты на основе платины, такие как цисплатин, вызывают повреждение ДНК, создавая внутрицепочечные аддукты между основаниями, что приводит к апоптозу опухолевых клеток [34].

Экцизионная репарация нуклеотидов (Nucleotide excision repair, NER) [35] и гомологичная рекомбинационная репарация [36] опосредуют лекарственную устойчивость при раке. Белки регуляции репарации также вовлечены в становление резистентного фенотипа. Так мутации в гене APC при трижды негативном раке молочной железы приводят к усилению репарации ДНК и активности алкилтрансфераз, опосредуя устойчивость к доксорубину [37]. Следовательно, ингибирование этих систем будет повышать чувствительность раковых клеток к лекарствам, повышая эффективность химиотерапии. Разработано несколько препаратов, воздействующих на этот аспект устойчивых к лекарствам раковых клеток [38]. Так ингибирование PARP1 в опухолях с неактивным BRCA1 приводит к синтетической летальности, причем данный эффект довольно специфичен, так как в здоровых клетках оба гена активны.

1.2 Механизмы гибели клеток

1.2.1 Апоптоз

Несмотря на накопление множества мутаций, изменение метаболизма, высокий уровень пролиферации и возможность бесконечного деления в опухолевых клетках всё ещё сохраняются некоторые фенотипические и генетические признаки здоровых клеток той ткани, из которой они происходят, а значит во многих опухолевых клетках всё ещё можно запустить индукцию естественных механизмов гибели. Как уже было сказано выше, апоптоз во многих случаях ингибирован опухолевыми клетками, однако, применение релевантных

терапевтических воздействий или их комбинаций способно запускать этот механизм гибели.

Апоптоз представляет собой тип запрограммированной клеточной гибели, характеризующийся конденсацией хроматина, расщеплением белков специальными ферментами (каспазами), вздутием плазматической мембраны (блеbbingом), образованием апоптотических телец и гибелью клеток без инициации воспалительной реакции. Апоптотическая гибель клеток играет существенную роль в развитии организма, органогенезе, гомеостазе и контроле роста опухолей [39, 40]. Развитие апоптоза происходит по внутреннему или внешнему сигнальному пути.

Активация апоптоза представляет собой сложный процесс, который зависит от нескольких сигнальных путей [41]. Как правило, этот процесс регулируется семейством цистеин-аспарагиновых протеаз (каспаз). Говоря в общем, каспаза-8 активируется в ответ на внеклеточный сигнал об индукции гибели, который воспринимается специальными рецепторами [42], в то время как каспаза-9 становится активной при внутриклеточных нарушениях [43]. Каспазы-3, -6 и -7 являются эффекторными, то есть отвечают за расщепление множества белков, включая белки репарации и клеточного цикла, что и приводит к гибели [44, 45, 46].

Большинство химиотерапевтических препаратов направлены именно на индукцию апоптоза за счёт повреждений ДНК, остановки клеточного цикла, блокирования проонкогенного сигналинга [47]. Ингибирование механизмов апоптотической гибели таким образом является важнейшей стратегией, которую опухолевые клетки используют для поддержания своей выживаемости, о чем ещё пойдет речь ниже.

1.2.2 Некроз

Некроз рассматривался как нерегулируемый тип гибели клеток, протекающий в неупорядоченной и случайной форме. Действительно, некротические явления имеют отчетливые морфологические особенности и

характеризуются быстрой пермеабиллизацией плазматической мембраны. Однако в настоящее время известно, что протекание некроза контролируется несколькими путями. Более того, некротическая гибель может выступать нормальным физиологическим явлением [48, 49].

Ключевая особенность некроза в том, что этот тип гибели реализуется за счёт повреждений мембраны, через которые внутриклеточное содержимое поступает наружу, вызывая иммунный ответ. Центральным фактором, регулирующим данные процессы, является TNF α (tumor necrosis factor α), который также влияет и на клеточную пролиферацию и экспрессию провоспалительных генов [50]. При этом особенностью сигналинга, индуцированного TNF, является то, что он может как убивать опухолевую клетку, так и способствовать её росту и пролиферации.

Существует терапия, направленная как на индукцию TNF α или применение самого фактора в качестве терапевтического агента, так и преследующая своей целью ингибирование TNF-индуцированного сигналинга. Изначальное исследование, положившее начало интенсивному изучению TNF, подразумевало именно первый подход [51, 52]. Несмотря на открытие противоопухолевого эффекта, вызванного TNF α , исследования продолжают до сих пор. Так в недавней работе отечественных исследователей проводилось испытание препарата Рефнот, представляющего собой рекомбинантный белок, состоящий из TNF α с тимозином альфа 1 [53]. Препарат показывает многообещающие результаты в лечении трижды-негативного рака молочной железы. Ингибиторы же TNF α являются, в основном, антителами или частями антител и включают такие препараты как адалибумаб, инфликсимаб, цертолизумаб, голимумаб [50]. Следует отдельно отметить, что некроз может способствовать прогрессированию опухоли за счёт усиления пролиферации клеток и ангиогенеза [54]. Таким образом, его ингибирование через TNF α может останавливать эти процессы и приводить к торможению роста опухоли.

Следует также отметить, что по некоторым данным у некроза, активируемого сигнальными каскадами, также существует своя классификация, так к программируемому некрозу относят некроптоз, ферроптоз и пироптоз [55]. Эти типы гибели будут в подробностях рассмотрены далее, сейчас лишь стоит отметить, что классификация механизмов гибели постоянно развивается и пересматривается, так как открываются новые механизмы и дополняются сведения о старых [56]. Кроме того, некоторые факторы, например, TNF, могут принимать участие в функционировании нескольких связанных с гибелью сигнальных каскадов.

1.2.3 Некроптоз

Термин «некроптоз» относится к частному случаю некроза. Прогрессирование некроптоза в большей степени зависит от передачи сигналов через взаимодействующую с рецептором киназу 1 (RIPK1). Индукция некроптоза приводит к ингибированию каспазы-8 (и, таким образом, к ингибированию апоптоза) и образованию некротом. Ингибирование апоптоза также может запускать некроптоз [57].

Некроптоз может запускаться через индукцию нескольких сигнальных путей, в частности, TNF, FAS/TRAIL, TLR3, $INF\alpha/\beta$ [58]. В отличие от апоптоза, некроптоз является надежным механизмом, запускающим иммунный ответ, который может дополнительно уничтожать опухолевые клетки. Кроме того, в настоящее время в стадии клинической разработки находятся несколько противоопухолевых препаратов, например, SMAC или ВНЗ. Глубокое и полное понимание взаимодействия между некроптозом, апоптозом и другими видами гибели клеток позволит разработать новые терапевтические подходы для повышения эффективности лечения опухолей [59, 60].

1.2.4 Ферроптоз

Активное изучение механизмов клеточной гибели на молекулярно-биологическом уровне позволило выявить признаки гибели, которые были не характерны ни для одного известного механизма, что привело к необходимости

вводить новые понятия и термины. Одним из них стал «ферроптоз», так же известный как «окситоз», механизм клеточной гибели, протекающий через окислительное повреждение фосфолипидов плазматической мембраны. Причем реализация этого механизма зависит от наличия металлов, особенно железа, что и дало ему название [61, 62]. Морфологически ферроптоз довольно похож на некроптоз, однако, активируется он при повышении внутриклеточной концентрации железа, либо при наличии дисбаланса в антиоксидантной системе глутатиона. Хелаторы железа и жирорастворимые антиоксиданты, такие как убихинон или альфа-токоферол, могут блокировать гибель клеток [63]. Ферроптоз может иметь большое значение для терапии опухолевых заболеваний по двум причинам: (1) из-за ингибирования апоптоза существует необходимость в поиске новых мишеней и путей, активирующих иные формы гибели; (2) нарушения в метаболизме приводят к накоплению в опухолях металлов, включая и железо, что позволит легче активировать ферроптоз в таких клетках [64].

1.2.5 Купроптоз

Термин «купроптоз» был введен лишь недавно в 2022 году в статье, вышедшей в журнале Science [65]. Исследование посвящено изучению активности элескломола, вещества-ионофора, которое способствует транспорту меди внутрь клетки. Увеличение концентрации внутриклеточных ионов меди приводит к клеточной гибели, признаки которой отличаются от апоптоза, некроптоза или ферроптоза. Особенностью купроптоза является связь этого механизма гибели с уровнем липоилирования внутриклеточных белков. Также удалось зафиксировать влияние повышенных концентраций меди на метаболическую активность митохондрий и на активность белков с Fe-S-кластерами в составе. Купроптоз не ингибируется пан-каспазными ингибиторами, некростатином-1 или ферростатином-1, однако, может быть остановлен хелаторами меди, ингибированием комплексов I/III электрон-транспортной цепи или ферредоксина-1 (FDX1), который способен восстанавливать медь до токсичного одновалентного

состояния, а также, как выяснилось в работе, принимает участие в регуляции липоилирования.

Так как механизм купроптоза был открыт и описан лишь недавно, пока имеется недостаточно сведений о его практическом применении в терапии, однако, очевидно, что совсем скоро будут появляться всё новые вещества, нацеленные именно на этот механизм. Авторы статьи подчеркивают, что важность их исследования заключается в возможности подбора более рационального и направленного подхода к использованию препаратов-ионофоров меди.

1.3 Активные формы кислорода в норме и патологии

Активные формы кислорода (АФК) являются классом молекул, в который входят частично восстановленные или возбужденные формы кислорода с чрезвычайно высокой реакционной способностью [66, 67]. Установлено, что в клетке присутствуют четыре основных молекулы, относящихся к АФК: супероксид анион (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($\cdot OH$) и синглетный кислород (O_2^1). Все они отличаются друг от друга биохимическими свойствами, периодом полужизни, местом и способом формирования, а также миграционной способностью (Таблица 1).

Таблица 1. Биохимические свойства различных типов АФК (переведено и адаптировано из [68]).

АФК	Период полужизни	Дистанция миграции	Механизм действия	Место образования	Система нейтрализации
Супероксид (O_2^-)	1-4 мкс	30 нм	Реагирует с Fe-S кластерами. Разлагается до H_2O_2	Митохондрии, пероксисомы, ЭТЦ	Супероксид дисмутаза, аскорбат
Гидроксильный радикал ($\cdot OH$)	1 нс	1 нм	Чрезвычайно реактивен со всеми биомолекулами	Реакция Фентона	Пролин, сахара, аскорбат
Перекись водорода (H_2O_2)	>1 мс	>1 мкм	Реагирует с цистеином и метионином в белках, гемом, ДНК	Пероксисомы, митохондрии	Каталаза, глутатионпероксидазы, аскорбат
Синглетный кислород (O_2^1)	1-4 мкс	30 нм	Окисляет липиды, белки, и остатки гуанина в ДНК	Мембраны, ядро	Каротиноиды и альфа-токоферол

Основным источником АФК внутри клеток являются митохондрии [69], так как именно в них происходят реакции окислительного фосфорилирования,

сопряженные с утечкой электронов и последующим формированием супероксидного радикала. Супероксидный радикал, претерпевая дальнейшие превращения, способствует появлению перекиси водорода, а затем и гидроксильного радикала, довольно опасного с биологической точки зрения соединения.

Негативное действие АФК связано с их способностью реагировать с широким спектром химических субстратов, приводя к их химической модификации и, зачастую, утрате биологической функции [70]. Наибольшими последствиями обладают модификации ДНК, так как они могут приводить к накоплению мутаций или даже гибели клетки. АФК способны модифицировать азотистые основания образуя их 8-оксо-производные или двуцепочечные разрывы. Известно, что большинство генотоксических воздействий опосредованы генерацией АФК, например, ионизирующая радиация кроме прямого повреждения ДНК приводит к радиолизу воды и появлению АФК, которые наносят дополнительный ущерб [71]. Доксорубин и цисплатин, конвенциональные химиотерапевтические препараты, также могут вызывать окислительный стресс [72].

Несмотря на столь негативные эффекты, вызываемые окислительным стрессом, доказано, что АФК не просто побочный продукт метаболизма, играющий в основном отрицательную роль, но также и участники нормального функционирования клетки, выполняющие несколько различных функций, которые важны для пролиферации клеток, иммунного ответа и апоптоза [73, 74]. Так было показано участие АФК в функционировании таких сигнальных путей как MAPK, NF κ B, Pi3K/Akt [73]. Также, как уже было отмечено ранее, они занимают одно из центральных мест в реализации ферроптоза. Таким образом, наличие АФК необходимое условие нормального роста и функционирования клетки.

Какова роль АФК в онкогенезе? Прежде всего, окислительное повреждение геномной и митохондриальной ДНК приводит к мутациям, а значит может привести и к формированию опухоли [75]. Дальнейшая судьба уже возникшего

новообразования во многом зависит от уровня генетической нестабильности. Так как АФК являются основным источником мутаций, уровень внутриклеточного окисления раковых клеток выше, чем у здоровых [76]. Кроме того, АФК в опухоли способствуют выживанию, посредством активации нескольких онкогенных сигнальных путей [77]. Например, H_2O_2 может окислять остаток цистеина в тирозинфосфатазе 1B, инактивируя его и стимулируя сигналы от факторов роста [78]. С другой стороны, активация некоторых онкогенов, таких как *c-Myc*, *Ras* или *BCR-Abl* может привести к повышению продукции АФК, что в свою очередь усилит активность этих онкогенов, спровоцировав петлевую стимуляцию. Кроме того, онкоген *Ras* способствует окислительному стрессу не только за счет прямой активации NOX, но также через ингибирование антиоксидантного белка сестрина-1 (SESN1) [79].

1.3.1 Оксидативная терапия

Различия в уровне АФК между раковыми и здоровыми клетками создают терапевтическое окно, которое можно использовать для воздействия на опухолевые ткани. Есть две основные стратегии, противоположные друг другу: 1) нейтрализация высокого уровня окисления внутри клеток с помощью антиоксидантов и последующей дезактивацией соответствующих сигнальных путей; 2) повышение уровня окисления различными прооксидантами [77]. Первый подход может быть реализован за счет простого приёма антиоксидантов, таких как витамин С, Е или β -каротин, с пищей, но есть опасения, что этот подход будет противодействовать обычной химио- или лучевой терапии [80]. Известно, что в раковых клетках некоторые антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза (СОД1) или каталаза, менее функциональны, чем в здоровых тканях, что является результатом анаэробного метаболизма [81]. В нескольких исследованиях предлагается повысить внутриклеточный уровень СОД1 при помощи инсерции гена или доставки фермента для уменьшения уровня АФК и ингибирования АФК-зависимого сигналинга [82, 83]. Несмотря на имеющиеся ограничения, связанные с доставкой и низкой специфичностью

генетической инсерции, СОД1 может служить эффективным средством для предотвращения метастазирования [77, 84].

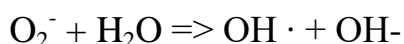
Что касается второго подхода, то известно о целом ряде прооксидантных препаратов и методов. Одним из классических примеров является фотодинамическая терапия, в которой вещество фотоиндуктор вводится в клетку, после чего лазерная эмиссия, направленная точно на опухоль с накопленным веществом-фотоиндуктором, инициирует реакцию генерации АФК и гибель клетки [85]. Таргетность достигается как за счёт восприимчивости клеток к окислительному стрессу, так и за счёт направления лазерного излучения только в сайт размещения опухоли. Кроме того, разрабатываются химиотерапевтические агенты, способные индуцировать АФК без внешних воздействий. Например, паклитаксел вызывает образование АФК через активацию JNK и p38 [86]. Элескломол оказывает цитотоксическое действие *in vitro* за счет генерации АФК и активации генов, специфичных для окислительного стресса. Кроме того, он усиливает противоопухолевую активность паклитаксела *in vivo* [87]. Цель этих стратегий – приблизить уровень окислительно-восстановительного потенциала к порогу гибели клеток, в то время как нормальные клетки будут испытывать умеренный окислительный стресс. Хотя многие проапоптотические сигнальные пути подавляются при раке, окислительное воздействие способно вызвать апоптоз или некроз в зависимости от степени повреждений.

1.4 Применение медьсодержащих соединений в противоопухолевой терапии

1.4.1 Биологические свойства меди

Медь – важный и распространенный элемент внутри организма, жизненно необходимый для его нормального развития и функционирования. Этот металл относится к группе переходных металлов, куда также входят цинк и железо. Медь способна находиться в двух степенях окисления, что позволяет ей принимать участие в определённом спектре окислительно-восстановительных реакций, что и определило её роль как кофактора в некоторых ферментах [88].

С биологической точки зрения, медь крайне тесно связана с АФК и окислительным стрессом. Дело в том, что свободные ионы двухвалентной меди токсичны для клетки из-за способности легко принимать электроны от супероксидного радикала и передавать их на воду, приводя к генерации гидроксильного радикала, который, как упоминалось ранее, является крайне опасной формой АФК. Данные превращения объясняются реакциями Фентона и Габера-Вейсса [89]:



Данная реакция способна протекать сама по себе, однако, присутствие переходных металлов значительно её ускоряет [90]. Ионы железа, ванадия, хрома и кобальта могут участвовать в этих превращениях. Этой же способностью обладает и медь, поэтому в организме она быстро связывается специализированными белками. Причем в условиях *in vivo* не только супероксид, но и другие такие соединения, как аскорбат, НАДФН, хиноны и семихиноны, вероятно, могут восстанавливать ионы металлов и способствуют образованию гидроксильного радикала [91]. Высокая биологическая активность меди способствовала созданию множества препаратов на её основе, а также препаратов, действие которых опосредуется через воздействие на внутриклеточный метаболизм этого металла.

Преимуществом металлолекарств на основе меди в сравнении с препаратами тяжёлых металлов является меньшее побочное влияние на здоровые ткани, так как медь способна включаться в естественный метаболизм [92, 93, 94]. Наиболее часто препараты меди сравниваются с соединениями платины, так как имеются свидетельства об общности поглощения и метаболизма этих веществ в организме [95]. Тем не менее, в данном обзоре мы коснемся не только соединений, в составе которых имеется медь, но и тех молекул, которые способны оказывать влияние на внутриклеточное распределение этого металла, тем самым влияя на рост и пролиферацию опухолевых клеток. Таким образом далее будут рассмотрены две группы соединений: 1) препараты, активность которых

направлена на взаимодействие с внутриклеточной медью и изменение её метаболизма; 2) препараты, активность которых реализуется за счёт наличия меди в их составе.

1.4.2 Препараты-модуляторы внутриклеточного перераспределения меди

Начнём с первой группы веществ. К ней относятся хелаторы и ионофоры. Первые обладают способностью связывать свободные ионы меди, тем самым выводя их из метаболизма, вторые же, транспортируют металл внутрь клетки, тем самым способствуя её накоплению до токсического предела [93]. Интересным фактом является то, что обе группы веществ используются для того, чтобы лечить другие заболевания, связанные с нарушением метаболизма меди. Хелаторы применяются при болезни Вильсона, ионофоры – Менкеса [96].

Противоопухолевый эффект хелаторов реализуется за счёт комплексного воздействия на опухолевую клетку, вызванного депривацией меди. Известно, что медь участвует в функционировании сигнальных каскадов и белков, отвечающих за рост и пролиферацию (например, MAPK-каскад [97, 98], NIF1 [99]), а также ангиогенез (например, лизил оксидаза (LOX)[100]). Связывая медь, хелаторы выводят её из активного метаболизма, тем самым блокируя так называемую купроплазию, медь опосредованную пролиферацию и рост клеток. К наиболее известным хелаторам относятся тетрадиолибдат [101], D-пенициламин [102, 103], триентин [104, 105]. Эффективность этих соединений была доказана на различных культурах опухолевых клеток, а также в некоторых *in vivo* исследованиях. Стоит отметить, что в некоторых случаях указанные вещества применялись в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами, в основном, цисплатинового ряда, что авторы исследований во многих случаях обосновывают повышением экспрессии медных транспортеров, которые способны захватывать и платиновые комплексы.

Действие ионофоров противоположно действию хелаторов. Они также связывают медь, однако, затем способствуют её транспорту и накоплению внутри клетки, тем самым увеличивая концентрацию до критического предела, что приводит к купроптозу [93]. Из-за ускоренного ангиогенеза и ростовых процессов

в опухолевой ткани наблюдается повышенная концентрация меди, таким образом дальнейшее её повышение приводит к необратимым повреждениям белков и ДНК, генерации АФК, нарушению функционирования митохондрий и клеточной гибели. К ионофорам меди относятся следующие соединения: дисульфирам [106], тиосемикарбазиды (аминотиомочевина) [107, 108], клиохинол [109]. Иногда ионофоры применяются в комбинации с дополнительным добавлением меди, что усиливает общий цитотоксический эффект. Одно из исследований, посвящённых активности N-ацетилцистеина, выявило его способность вызывать клеточную гибель при комбинировании с хлоридом меди [110], однако, авторы делают вывод об ином механизме работы такой комбинации, в частности, они считают, что в данном случае НАС выступает не как ионофор, а как «АФК-продуцент», что также совпадает с результатами нашего исследования.

1.4.3 Препараты на основе меди в терапии опухолевых заболеваний

Препараты, содержащие металл в своём составе, носят название «металлолекарства». Довольно много металлов может быть встроено в органический каркас и выступать в качестве активной части молекулы, меняя её активность и придавая веществу те или иные свойства [111, 112]. Медь не является исключением и активно применяется для создания металлолекарств, в особенности противоопухолевых препаратов в качестве альтернативы соединениям на основе платины [113]. При этом важно отметить, что назначение и форма медьсодержащих веществ различается довольно сильно. В зависимости от назначения медьсодержащих препаратов подразделяются на те, которые применяются для терапии и те, что подходят для диагностики. Помимо органических комплексов в данный момент активно разрабатываются наночастицы на основе меди, способные выступать в том числе в роли переносчиков других лекарств либо в качестве контрастного агента.

Терапевтическое действие наночастиц и органических комплексов меди довольно вариативно. Основные эффекты, наблюдаемые на клеточном уровне, напоминают таковые для ионофоров и проявляются в виде индукции АФК, нарушения функции митохондрий, ингибировании протеасомной деградации и

топоизомеразной активности, повреждении ДНК, индукции апоптоза или парптоза [114]. Действие наночастиц и комплексов при этом может отличаться.

Использование наночастиц в биомедицинской практике приковало к себе внимание многих исследователей. Наномедицина стала современной и быстро развивающейся областью. Несколько видов наночастиц на основе металлов (MNP) одобрены FDA для использования в клинической практике для визуализации и доставки лекарств [115, 116]. Помимо этого, активно ведутся исследования, направленные на создание металлических наночастиц, способных выступать в качестве самостоятельного терапевтического агента, и к медным наночастицам приковано достаточно большое внимание [117, 118].

В настоящей работе использовались наночастицы оксида меди, которые активно изучаются в контексте их дальнейшего биомедицинского применения. Такие наночастицы без или с химическими модификациями использовались для борьбы с раком печени [125], простаты [126] и почек [127]. Конкретизируя механизмы влияния наночастиц оксида меди в исследовании на опухолевых клетках рака простаты PC-3 учёные выявили снижение экспрессии генов ключевых участников Wnt-каскада [126]. В работе с использованием клеток HeLa [128] исследователи обнаружили специфическое воздействие наночастиц CuO на митохондрии клетки, реализуемое через транспорт этих наночастиц напрямую к органеллам. Касаемо *in vivo* исследований наночастиц оксида меди, было показано, что они способны угнетать рост и пролиферацию клеток меланомы в мышинной опухолевой модели [129, 130], при этом методом TUNEL была определена апоптотическая природа гибели. Модифицирование поверхности полиэтиленгликолем (ПЭГ) позволяет улучшать фармакокинетику медных наночастиц, а также облегчать их проникновение внутрь клеток [131]. В современных работах, о создании металлических наночастиц, немалая доля посвящена так называемому «зелёному» синтезу, подходу при котором металлические наночастицы получают из экстрактов растений [119]. Полученные таким способом медные частицы проявляют значимую противоопухолевую активность [120, 121, 122, 123]. В большинстве работ

антипролиферативный эффект наночастиц связывают с их антиоксидантными свойствами, что по всей видимости связано с наличием остаточных фенольных добавок после очистки экстрактов растений. Наночастицы, синтезированные классическими химическими методами, демонстрируют более «жесткое» влияние на клетку, связанное уже с генерацией АФК и повреждением макромолекул [124].

Что же касается медьорганических комплексов, то их разнообразие и число публикаций об их противоопухолевых свойствах растёт стремительными темпами [132]. Появление и распространение медных комплексов как противоопухолевых препаратов связано с успешным применением цисплатина в клинической практике и попыткой создать столь же эффективные, но более безопасные аналоги [133]. Так как в организме существуют специализированные пути поглощения, перераспределения и утилизации меди, не возникает проблемы её накопления и отложенной токсичности, поэтому комплексы на основе меди считаются лучшей альтернативой платиновым препаратам.

Большое количество публикаций описывает медьорганические комплексы, которые проявляют функции ингибиторов протеасом [134, 135, 136]. При этом активность таких ингибиторов отличалась не только для опухолевых и здоровых тканей, но и для опухолевых культур клеток различного гистогенеза. Таким образом, специфичность медьорганических комплексов может быть довольно большой, а действие – органеллоспецифичным. Кроме этого, органические комплексы меди, как уже было указано выше, индуцируют пертурбации окислительно-восстановительного баланса, повреждения ДНК и белков, нарушение функции митохондрий, ингибирование топоизомеразы, апоптоз.

1.4.4 Применение препаратов на основе меди в диагностике опухолевых заболеваний

Также отдельно стоит описать потенциал применения наночастиц и медьорганических комплексов в диагностике опухолей. Последние разработки в области технологий визуализации и молекулярной биологии позволяют не только визуализировать опухоль, но и оценивать экспрессию и активность конкретных молекул (например, протеинкиназ или ферментов). Помимо этого, представляется

возможным оценка различных процессов таких как уровень метастазирования, процент апоптотической гибели опухолевых клеток, ангиогенез, которые так или иначе способствуют развитию опухоли, и принимают участие в её ответе на терапию и развитии рецидива [137].

К типичным методам визуализации относятся компьютерная томография (КТ), магнитно-резонансная томография (МРТ), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) и мультиспектральная оптоакустическая томография (МСОТ) [138]. Основным применением соединений меди для визуализации является их использование в качестве контрастного агента для ПЭТ или МРТ. Например, медь используется при ПЭТ-сканировании в качестве радиофармпрепарата для диагностики рака, а изотоп ^{64}Cu в составе хлорида успешно прошел клинические исследования, демонстрирующие его диагностический потенциал [139]. Наночастицы CuS нашли своё применение как в ПЭТ, так и в МСОТ [140, 141]. Кроме того, наночастицы на основе меди также применяются в комбинированной фототермической терапии [142]. Эти свойства позволяют сочетать диагностическую и терапевтическую модальности в одном препарате, таким образом приводя к созданию тераностических противоопухолевых средств, значительно ускоряющих лечение и повышающих шансы пациента на излечение [143].

В данной работе мы показываем, что НЧ CuO и медьорганические комплексы обладают схожими характеристиками, а их цитотоксичность в присутствии *N*-ацетилцистеина возрастает многократно. Реализация этого эффекта наблюдается для различных культур опухолевых клеток и обеспечивается индукцией окислительного взрыва. Терапевтическое воздействие позволяет обойти механизмы приобретённой лекарственной устойчивости, что может иметь огромное клиническое значение. Механизм клеточной гибели комплексный, не задействует активацию проапоптотических каскадов и вызывается повреждением плазматической мембраны. Испытания на животных позволили выявить максимальные переносимые дозы веществ и достоверное торможение роста опухоли. Присутствие двух агентов в комбинации

обеспечивает широкий спектр манипуляций с целью управления эффективностью всей системы. Материалы, полученные в работе, закладывают фундамент для создания фармацевтического препарата на основе указанной комбинации в качестве средства для терапии опухолей с фенотипом приобретённой лекарственной устойчивости, которые перестали отвечать на стандартные протоколы лечения. Различные модификации наночастиц, а также медь-органических комплексов позволят повысить специфичность системы, повысить её биодоступность и эффективность.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Источник наночастиц, солей и органических комплексов меди

Наночастицы были синтезированы методом преципитации, описанным ранее [98]. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяли в 100 мл деионизированной воды так чтобы финальная концентрация составляла 0,01 М. После нагревания до 98 °С к раствору добавлялся 1 М NaOH при интенсивном перемешивании. Быстрое образование черного осадка свидетельствовало об успешном прохождении реакции. Этот осадок дважды поочерёдно промывали в этаноле и деионизированной воде при помощи центрифугирования при 10000 об/мин в течение 10 минут. Размер наночастиц определялся методом динамического светорассеяния (ДРС) с использованием прибора Photocor EPM/Photocor CompactZ и сканирующей электронной микроскопией с использованием прибора Tescan VEGA3 с классическим вольфрамовым катодом.

Ацетат меди был получен от ЛенРеактив (Санкт-Петербург, Россия). Органические комплексы меди: [(Z)-3-(2-флуорофенил)-2-метилтио-5-(пиридин-2-илметил)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он] медь (II) дихлорид, [(Z)-3-(2-флуорофенил)-2-метилтио-5-(пиридин-2-илметил)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он] медь (I) дихлорид, бис[(Z)-3-(2-флуорофенил)-2-тио-5-(пиридин-2-илметил)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он] медь (+1,5) μ -хлорид и соответствующие органические лиганды без металла были синтезированы и любезно предоставлены кафедрой электрохимии Московского Государственного Университета (МГУ) им. М.В. Ломоносова.

2.2 Культивирование клеточных линий

Культуры клеток хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) человека (K562), трижды негативной карциномы молочной железы (MDA-MB-231) и аденокарциномы толстой кишки (HCT116) были получены из Американской коллекции типовых культур (Манассас, Вирджиния). Линии клеток B16-F10 (меланома мыши), K562/4 (подтип ХМЛ с экспрессией гена MDR-1) и ПФЧ

(постнатальных фибробластов) были любезно предоставлены НМИЦ онкологии им. Блохина (Москва, Россия). Клетки культивировались в среде RPMI-1640 или DMEM (Биолот, Санкт-Петербург, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco) и 0,5% (50 мкг/мл) гентамицина (Biolog) при 37 °C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. Пересев клеток проводился при достижении ими 90% конfluence, для открепления адгезионных культур использовался раствор Версена (Биолот).

2.3 Анализ цитотоксичности

Жизнеспособность клеток оценивали, используя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ), который восстанавливается митохондриальными НАДФ-зависимыми оксидоредуктазами до нерастворимого формазана, имеющего фиолетовый цвет. МТТ-тест проводили в 96-луночном планшете с плоским дном (Eppendorf). В каждую лунку было добавлено по 5×10^3 клеток. Для адгезионных культур проводилась дополнительная инкубация 24 часа для прикрепления. Каждое вещество растворяли в питательной среде для достижения различных конечных концентраций. После инкубации с агентами в течение 72 часов, к клеткам непосредственно в среду добавлялось 20 мкл раствора МТТ для получения конечной концентрации 0,5 мг/мл. После инкубации в течение 2 часов, среду отбирали, и кристаллы формазана растворялись в 200 мкл ДМСО. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Tecan Infinite 50 используя длину волны 570 нм.

2.4 Проточная цитофлуориметрия

2.4.1 Кинетика гибели клеток

Кинетику гибели клеток оценивали с использованием красителя пропидий йодид (PI) и проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, США). Комбинация НЧ CuO (100 нг/мл) и NAC (2,5 мМ) была добавлена к клеткам K562, посеянным в 24-луночный планшет при плотности 5×10^4 клеток на лунку. Клетки каждый час отбирали для анализа и инкубировались с PI (10 мкг/мл) для 2 минуты в темноте. Интенсивность флуоресценции измеряли в канале фикоэритрина (PE,

585/42 нм). Данные были проанализированы с использованием программы CytExpert (Beckman Coulter, США) и Microsoft Excel.

2.4.2 Детекция АФК

Краситель CM-H2DCFDA (ThermoFisher, США) использовался для оценки общего окислительного стресса. Клетки K562 были переведены в пробирки в количестве 2×10^5 в каждую и ресуспендированы в свежей среде, в которую затем добавлялся краситель на 1 час. После этого клетки вновь переносились в свежую среду, содержащую 1 мкг/мл CuO и 2,5 мМ NAC в комбинации или по отдельности добавлен в соответствующие пробирки на 1, 2, 3 и 4 часа. Положительный контроль был реализован с использованием 5 мМ H₂O₂. Интенсивность флуоресценции регистрировалась в канале FITC.

2.4.3 Окрашивание Аннексин V-FITC/PI

Клетки K562 были помещены в 6-ти луночные планшеты (Eppendorf) 2×10^5 клеток на лунку и обработаны комбинацией НЧ CuO 0.1 мкг/мл и NAC (2,5 мМ) на 4-24 часа. Затем клетки окрашивались 15 минут Аннексином V-FITC (Dead Cell Apoptosis Kit for flow cytometry; Thermo Fisher Sci., Waltham, MA) при комнатной температуре. После отмывки в фосфатном буфере клеточная популяция окрашивалась PI (10 мкг/мл). Интенсивность флуоресценции записывалась в канале FITC и PE.

2.4.4 Распределение фаз клеточного цикла

Клетки K562 (2×10^5) предварительно помещались в 6-луночные планшеты на день. Затем в соответствующие лунки добавляли 100 нг/мл НЧ CuO и 2,5 мМ NAC на 6 или 24 часа. Далее клетки осаждали и лизировали в буфере, содержащем 50 мкг/мл PI, 0,1% цитрата натрия, 100 мкг/мл РНКазы Н и 0,3% NP-40, в течение 30 минут в темноте. Интенсивность флуоресценции регистрировалась в канале PE.

2.4.5 Трансмембранный потенциал митохондрий

MitoTracker™ Red CMXRos (Thermo Fisher Sci.) использовали для мониторинга митохондриального потенциала. Популяция культуры клеток ХМЛ обрабатывалась комбинацией НЧ CuO (100 нг/мл) и 2,5 мМ NAC в течение 4-24 часов. MitoTracker (конечная концентрация 85 нМ) добавляли к клеткам за 30 мин до завершения инкубации. Перед анализом на проточном цитофлуориметре клетки промывались холодным PBS, интенсивность флуоресценции анализировалась в канале аллофикоцианина (APC) (660/10 нм).

2.4.6 Иммуноокрашивание

Клетки K562 обрабатывали 100 нг/мл НЧ CuO в отсутствие или в присутствии 2,5 мМ NAC в течение 6 и 24 часов. После фиксации в 0,75% параформальдегиде в течение 15 минут и пермеабилзации в ледяном метаноле в течение 30 минут клетки промывали PBS и инкубировали с кроличьими антителами против расщепленной каспазы 3 и поли(АДФрибозы)-полимеразы (PARP) (Cell Signaling, Danvers, MA; 1:1000) в течение 1 часа. Метанол отмывался при помощи фосфатного буфера, после чего добавлялись вторичные козьи антитела, конъюгированные с AlexaFluor 488 (Thermo Fisher Sci; 1:1000), клетки инкубировались в течение 1 часа и анализировались при проточного цитофлуориметра в канале FITC.

2.5 Конфокальная микроскопия

Конфокальная микроскопия с лазерным сканированием использовалась для визуализации морфологии митохондрий и контроля целостности плазматической мембраны после обработки НЧ CuO и NAC. Клетки НСТ116 высевали на чашки диаметром 35 мм со стеклянным дном (SPL Life Sci., Корея) и инкубировали 72 ч при 37 °С, 5% CO₂ до достижения ими 50% конфлюэнтности. Затем клетки инкубировали с НЧ CuO (1 мкг/мл) и NAC (2,5 мМ) в течение 1-24 ч с последующей промывкой PBS. Фотолон добавлялся на 3 часа (10 мкМ, освещение при 660 нм, 33 Дж/см²) выступая эталонным соединением для фотодинамического окислительного стресса и быстрого повреждения органелл [28] Для мечения митохондрий и ядер использовались соответственно дигидрорадамин 123 (DHR

123; (488 нм/510-570 нм)) и Hoechst 33342 (405 нм/415-470 нм) в соответствии с рекомендациями производителя (Thermo Fisher Sci.). PI (488 нм/550-600 нм) использовался для контроля целостности плазматической мембраны. Изображения анализировали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SPE 5 с программным обеспечением LAS AF (Leica Microsystems GmbH, Германия).

2.6 Иммуноблоттинг

Клетки K562 и HCT116 наращивались в чашках Петри диаметром 60 мм до конfluence 80%, затем обрабатывались НЧ CuO (100 нг/мл) и NAC (2,5 мМ) на 24 часа при 37 °С, 5% CO₂. Дох (0,2 мкМ) использовали в качестве контрольного соединения. После завершения обработки клетки лизировали в буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 50 мМ Трис (pH 8,0), 2 мМ фенилметилсульфонилфторид и коктейль ингибиторов белка (Roche) в течение 30 мин на льду. Концентрацию белка оценивали с помощью реактива Брэдфорда. Супернатант клеточного лизата, содержащий 35 мкг общего белка брался для белкового гель-электрофореза (SDS-PAGE) при 120 В на 1,5 часа. Далее белки переносились на нитроцеллюлозные мембраны 0,2 мкм (GE Healthcare, США). После блокирования обезжиренным молоком мембраны инкубировали с кроличьими антителами против расщепленного PARP человека и общей или расщепленной каспазы 3 (Cell Signaling) в течение ночи при 4 °С. После промывки мембраны инкубировались со вторичными козьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Cell Signaling). Белки визуализировали с помощью реагента усиленной хемилюминесценции и системы визуализации геля ChemiDoc MP (BioRad, США).

2.7 Атомно-абсорбционная спектроскопия.

Атомно-абсорбционная спектроскопия с целью выявления эффективности проникновения НЧ CuO в клетки была проведена совместно с Институтом проблем химической физики РАН (Черноголовка, Российская Федерация).

Клетки K562 высевали на культуральные чашки диаметром 35 мм с плотностью 100×10^3 клеток на чашку в 1 мл среды. К клеткам в трех чашках было добавлено 0,5 мкг/мл НЧ CuO, а к ещё одной такой группе – 5 мкг/мл НЧ CuO. Контрольные клетки оставались необработанными. Через 1, 6 и 24 часа клетки переносили в пробирки, центрифугировали от старых сред и ресуспендировали в дистиллированной воде для их лизиса.

Пробы были собраны и доставлены в Институт проблем химической физики РАН, где они были обработаны в горячей азотной кислоте. Анализ проводили на атомно-абсорбционном спектрометре AAS-3 (Германия). Полученные данные были проанализированы с помощью Microsoft Excel.

2.8 Эксперименты с искусственными мембранами

2.8.1 Формирование плоских бислоев и регистрация токов, протекающих через мембраны

Формирование бислоевых липидных мембран проводили по методу Монтала и Мюллера [Montall and Mueller, PNAS, 1972]. Мембраны формировали из 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ) и 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-глицерола) (ПОФГ). Эксперименты проводили при одинаковом ионном составе разделяемых мембраной водных растворов электролита (0.1 М KCl pH 7.4). Кислотность растворов (pH 7.4) поддерживали буферной смесью 5 мМ HEPES-KOH. NAC добавляли в цис-отсек камеры до конечной концентрации 1 мМ и далее пошагово добавляли наночастицы из CuO. В независимых экспериментах вводили в цис-отсек камеры отдельно 2,5 мМ NAC и наночастицы из CuO в концентрациях 1, 2 и 4 мкг/мл. Было проведено 3 независимых эксперимента (повтора) для каждой системы.

2.8.2 Флуориметрия утечки кальцеина из липосом

Однослойные везикулы из ПОФХ или ПОФГ, нагруженные флуоресцентным красителем кальцеином, формировали с помощью мини-экструдера производства “Avanti Polar Lipids, Inc” (США). Кальцеин, находящийся внутри липосом в концентрации 35 мМ, испытывает самотушение. Липосомную суспензию разделяли на аликвоты. Контрольные образцы не модифицировали. В экспериментальные образцы вводили НАС в концентрации 1 мМ и далее пошагово добавляли наночастицы из CuO. В независимых экспериментах отдельно вводили 2,5 мМ НАС и наночастицы из CuO в концентрациях 1, 2 и 4 мкг/мл. Было проведено 3 независимых эксперимента для каждой системы.

После этого измеряли интенсивность флуоресценции высвобожденного из липосом кальцеина (IF, %) с помощью спектрофлюориметра “Флюорат Панорама-02”; (при длине волны возбуждения 490 нм, эмиссии 520 нм). В конце эксперимента в раствор добавляли тритон X-100 до концентрации 10 мМ из водного раствора. Этот детергент вызывает разрушение липосомных мембран и полное высвобождение захваченного красителя.

2.8.3 Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия липосом

Большие однослойные везикулы формировали из 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ДПФХ) или 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-глицерола) (ДПФГ) в электрическом поле с использованием коммерческого прибора “Nanion vesicle prep pro” (Германия). Конечная концентрация липида составляла 3 мМ. В экспериментальные образцы вводили НАС в концентрации 1 мМ и далее пошагово наночастицы из CuO. В независимом эксперименте вводили наночастицы из CuO в концентрациях 1, 2 и 4 мкг/мл (без НАС).

Контрольные образцы не модифицировали. Термограммы липосомных суспензий получали при помощи дифференциального сканирующего микрокалориметра μ DSC7 (“Setaram”, Франция). Было проведено 2 независимых эксперимента для каждой системы.

Пики на термограммах характеризовали температурой предперехода (T_p) и максимума (T_m) и шириной основного пика на полувысоте ($T_{1/2}$), отвечающей кооперативности фазового перехода.

2.9 Исследование противоопухолевой активности комбинации наночастиц SiO_2 и N -ацетилцистеина на модели асцитной опухоли Эрлиха у мышей BALB/c

Исследования были проведены на самках мышей BALB/c с начальной массой тела – 20-25 г. Животные были получены из ФГУП "Питомник лабораторных животных "Рапполово" (Россия, Ленинградская область). После получения из питомника животные содержались в специальных помещениях на карантине 14 дней, после чего переводились в постоянные помещения и брались в эксперимент. Мыши ежедневно получали стандартный полнорационный брикетированный комбикорм, предназначенный для содержания лабораторных грызунов и кроликов производства компании «Лабораторкорм» (Москва, Россия). Для питья в поилки наливали водопроводную воду. Корм и питьевую воду животные получали без ограничений.

В течение эксперимента все животные находились в стандартных условиях, в соответствии с действующими нормативами:

- автоматически регулируемого искусственного освещения (12 часов свет, 12 часов темнота);
- температуре воздуха в помещении 20–23°C, относительная влажность воздуха – 55–65%;
- уборка помещений ежедневно, смена подстилочных опилок, питьевой воды, мытье и дезинфекция клеток и поилок 3 раза в неделю;

Все экспериментальные исследования проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986) и по правилам ГОСТ 33216-2014 "Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за

лабораторными грызунами и кроликами" под контролем этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» МЗ РФ.

Опухоль перевивалась однократно внутрибрюшинно (в/б). Вводили точное число клеток на мышь: 1×10^6 клеток в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. День перевивки опухоли считался нулевым днём. Рандомизацию и метку мышей проводили в день перевивки. В каждой группе животному ставили групповую метку. Наночастицы, медьорганический комплекс и N-ацетилцистеин растворялись в однократном стерильном PBS и вводились в брюшную полость животного через инсулиновый шприц. При введении комбинации компоненты предварительно смешивались и затем вводились в мышь.

Статистическую обработку данных производили в программных средах Microsoft Excel и GraphPad Prism 8. Анализ выживаемости основывался на методе Каплана-Мейера. Рассчитывали показатели МПЖ с 95% доверительным интервалом. Определение различий между групп проводились с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Получение медьсодержащих соединений

Наночастицы оксида меди (НЧ CuO) были синтезированы из сульфата меди методом преципитации. Такой метод синтеза является довольно простым, не требует дорогостоящего оборудования или реактивов, а также позволяет получать наночастицы с большим выходом. Ожидалось получить наночастицы размером до 200 нм. По результатам измерений синтезированных НЧ CuO, выполненных методом динамического рассеяния света (ДРС), размер частиц составил 80 ± 20 нм (Рисунок 2). Стоковый раствор (1,4 мг/мл в деионизированной воде) хранился при температуре $+4$ °С.

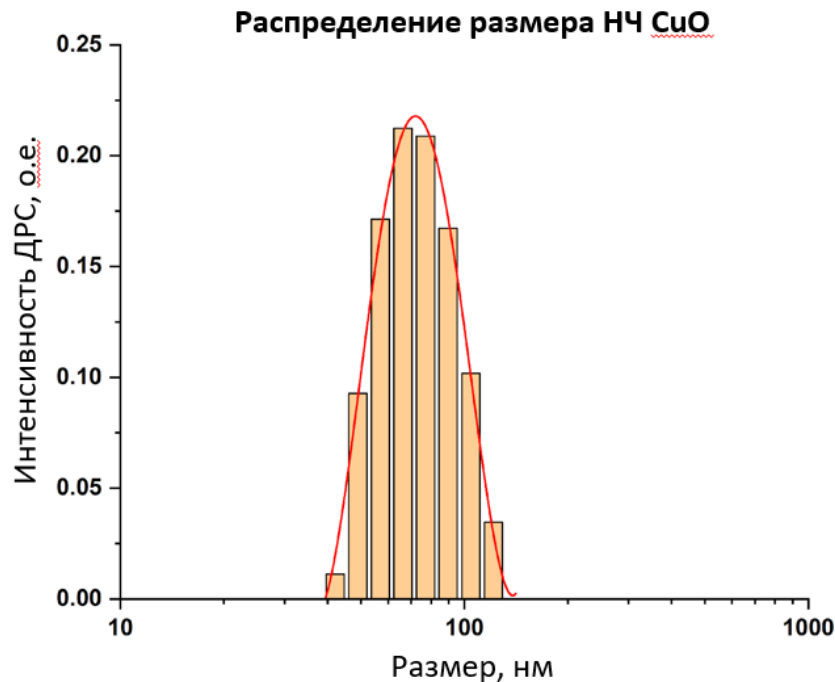


Рисунок 2. Распределение НЧ CuO по размерам. Средний размер составляет 80 ± 23 нм

Помимо этого, была также проведена характеристика полученных наночастиц методом сканирующей электронной микроскопии (рисунок 3). Из данных видно, что они практически совпадают с данными ДРС, морфология частиц оказалась несферической, вытянутой. Следует отметить, что водный раствор при описанных условиях хранения, оставался стабильным.

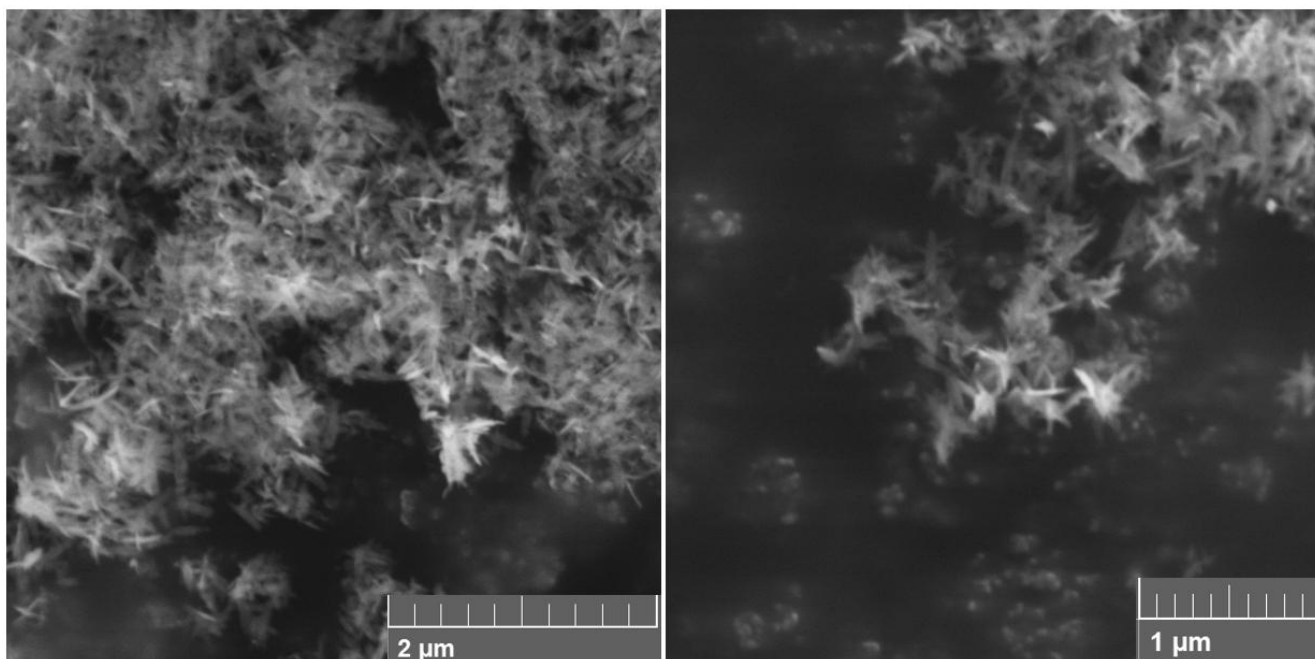
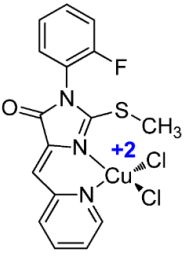
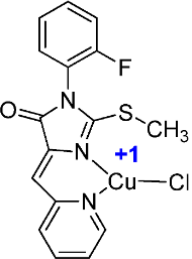
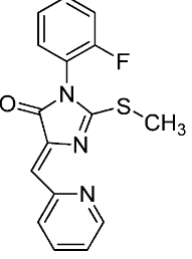
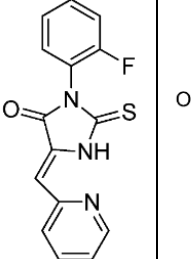
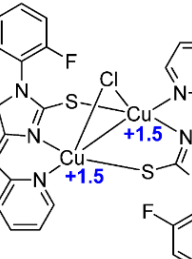


Рисунок 3. Сканирующая электронная микроскопия наночастиц оксида меди

Медьорганические комплексы были синтезированы и любезно предоставлены коллегами с кафедры органической химии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Формулы соединений представлены в таблице 1. Чистота всех синтезированных комплексов определялась методом ВЭЖХ-анализа на системе ВЭЖХ Ultimate 3000 (Thermo Fischer Scientific, США) с тройным квадрупольным масс-спектрометром TSQ Endura (Thermo Fischer Scientific, США), оснащенный колонкой XBridge Peptide BEH C18, 50x2,1 мм, размер частиц 5 мкм. Профили ВЭЖХ регистрировали УФ-детектором при 260 нм. Чистота всех соединений $\geq 95\%$.

Таблица 2. Названия и химические формулы медьорганических комплексов, использовавшихся в экспериментах

Название комплекса	FS-Me+2	FS-Me+1	FS-Me	Ftion	Ftion-k
Химическая формула					

Определение характеристик координационных комплексов проводилась методами циклической вольт-амперометрии (ЦВА) и вращающегося дискового электрода (ВДЭ). Результаты представлены на рисунке 4.

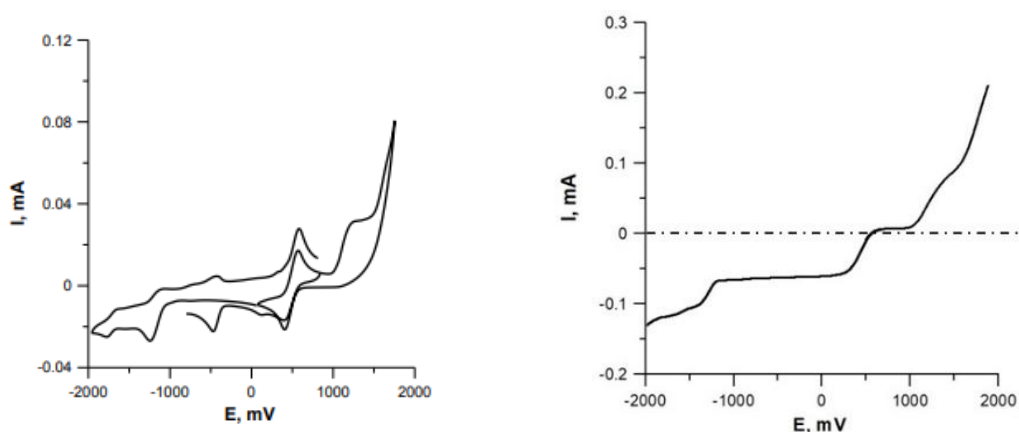


Рисунок 4. ЦВА (слева) и ВДЭ (справа) раствора координационного соединения FS-Me+2 в ДМФА (10^{-5} М).

Кроме этого, для более точного описания структуры полученных соединений дополнительно были записаны спектры XANES (X-ray absorption near edge structure), которые представлены на рисунке 5.

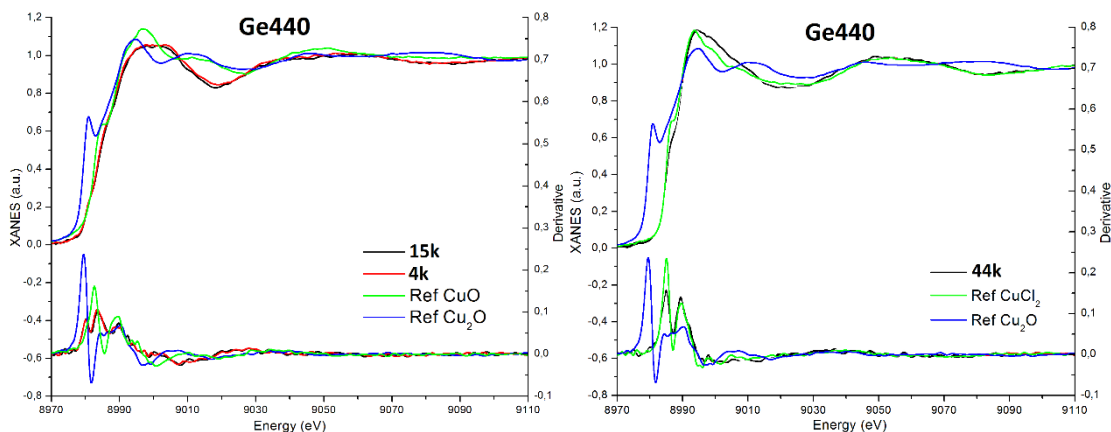


Рисунок 5. Спектры XANES координационных соединений Ftion-k (слева) и FS-Me+2 (справа) в сравнении со спектрами эталонных образцов CuCl_2 и Cu_2O .

Кроме того, панель медьсодержащих органических комплексов включала соединения порфиринового ряда, синтезированные в Институте элементоорганических соединений им. Несмеянова, формулы которых будут представлены ниже.

3.2 Цитотоксичность наночастиц CuO значительно повышается в присутствии *N*-ацетилцистеина

Жизнеспособность опухолевых клеток оценивалась при помощи МТТ-теста, применяемого для адгезионных культур, а также резазуринового теста – для суспензионных. Оба теста оценивают количество выживших после воздействия клеток за счёт измерения митохондриальной активности, что не всегда может являться истинным отражением выживаемости, поэтому дополнительно состояние клеток подтверждалось при помощи световой микроскопии. Как видно из рисунка 6 НЧ CuO (синяя кривая) демонстрируют умеренный цитотоксический эффект *in vitro*: IC_{50} варьирует в пределах 6-40 мкг/мл (таблица 3). В литературных источниках цитотоксический эффект оксида меди, а также других медьсодержащих соединений, связывают прежде всего с высокой реакционной активностью металла в воде, которая приводит к ускоренной продукции АФК и индукции окислительного стресса.

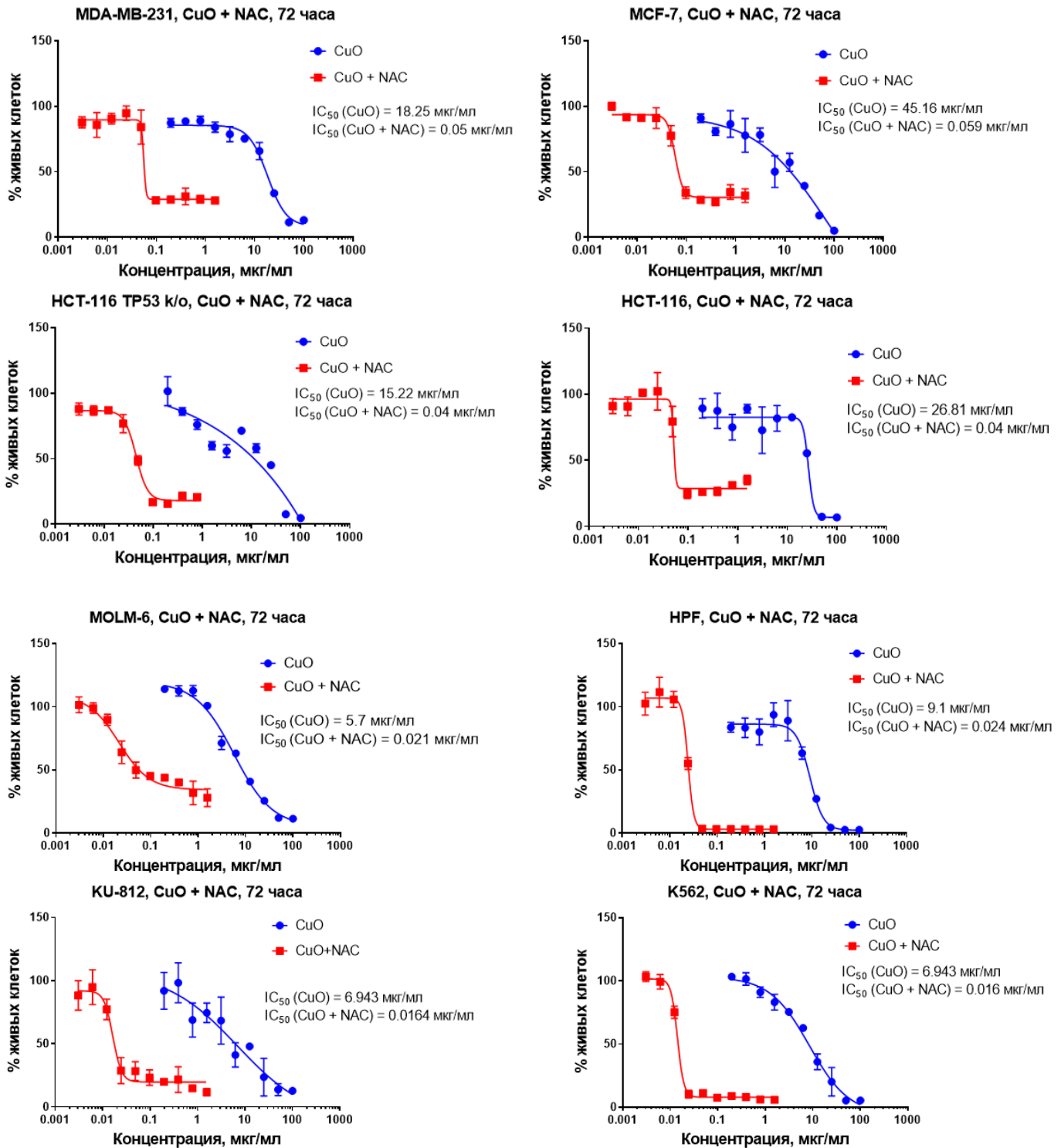


Рисунок 6. Жизнеспособность клеток после добавления НЧ CuO или комбинации НЧ CuO + NAC. Синяя кривая – НЧ CuO, красная – комбинация веществ.

Для проверки гипотезы о том, что именно окислительный стресс является причиной гибели в случае добавления НЧ CuO нами было решено попытаться предотвратить клеточную смерть при помощи N-ацетилцистеина (NAC). Это вещество является антиоксидантом, аналогом аминокислоты цистеин с

ацетильной группой у атома азота, и эффективно справляется с повышенными концентрациями АФК в клетке. Добавление НАС в концентрации 2,5 мМ за 15 минут до добавления исследуемого вещества является стандартным способом защиты клеток от окислительного воздействия. В нашем эксперименте, однако, введение НАС в культуральную среду до НЧ CuO не только не предотвращало клеточную гибель, но и резко увеличивало её (Рисунок 6, красная кривая). Следует отметить, что используемая концентрация НАС является нетоксичной, а само по себе соединение полностью биосовместимо.

Эффект усиления цитотоксичности НЧ CuO при добавлении НАС был далее проверен на панели клеточных культур различного тканевого происхождения для определения специфичности действия комбинации. Было выявлено, что он наблюдается для различных линий опухолевых клеток, как показано на рисунке 6 и в таблице 3, что указывает на его неспецифическую природу.

Таблица 3 – Значение IC50 для НЧ CuO в сравнении с НЧ CuO в комбинации с НАС для различных клеточных линий

Культура клеток	IC50 (CuO)*	IC50 (CuO + 2,5 мМ НАС)*	Потенцирование**
K562	8.5	0.01	850
K562/4	16.2	0.01	1620
MOLM-6	5.7	0.02	285
KU-812	7.0	0.02	350
HCT116	26.8	0.05	536
HCT116p53KO	15.2	0.04	380
MDA-MB-231	18.3	0.06	305
MCF-7	45.2	0.05	904
B16F10	17.6	0.06	293

SCOV-3	3.9	0.09	42
SCOV-3/CDDP	4.3	0.37	12
Ex vivo	11.3	0.048	237
hFB-hTERT6	9.1	0.02	455

**IC₅₀ (мкг/мл), среднее трёх экспериментов. **соотношение IC_{50CuO}/IC_{50CuO+NAC}*

Важно отметить, что клеточная линия K562/4 также восприимчива к действию комбинации (рисунок 7). Данная культура клеток характерна тем, что обладает повышенной экспрессией гена MDR1, кодирующего Р-гликопротеин, белок, обуславливающий устойчивость к доксорубину, противоопухолевому препарату из ряда антрациклинов. На графике отчетливо видно, что IC₅₀ доксорубина выше в случае K562/4 примерно в 18 раз в сравнении с клетками дикого типа. Для комбинации же различий в жизнеспособности между клеточными культурами не наблюдается, а значения IC₅₀ практически равны. Таким образом, взаимодействие НЧ CuO и N-ацетилцистеина приводит к реализации цитотоксического эффекта, который может применяться для преодоления сформированных механизмов лекарственной устойчивости.

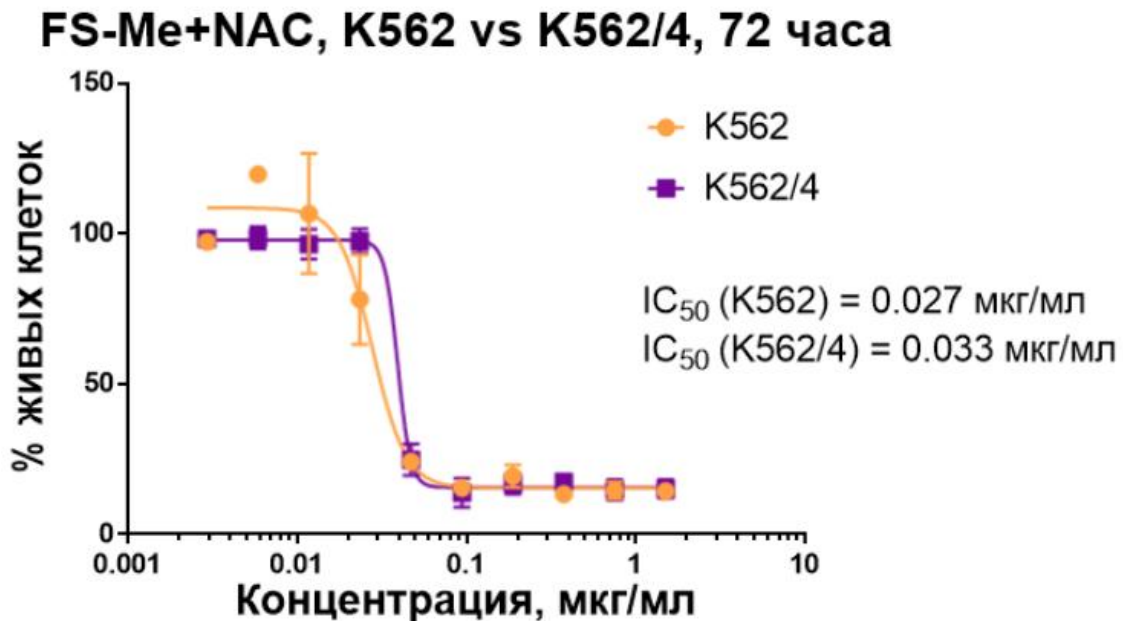
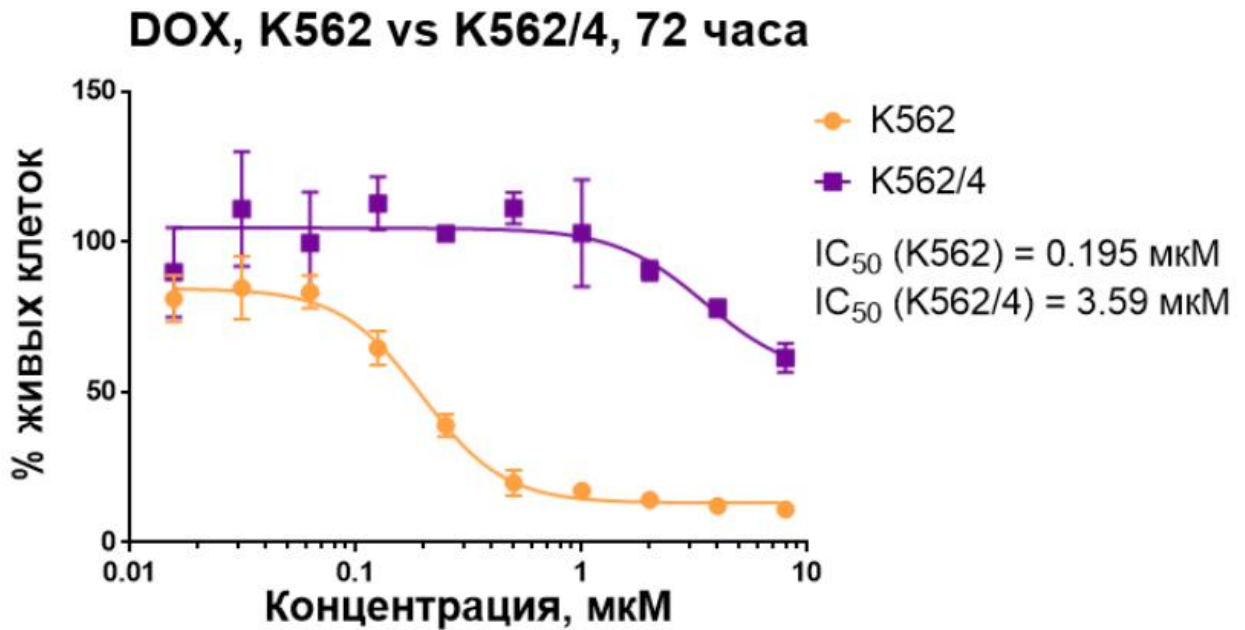


Рисунок 7. Сравнение цитотоксичности комбинации на клетках K562 и K562/4. (А) Значение IC_{50} доксорубина для K562/4 в 20 раз больше чем для клеток K562 из-за экспрессии MDR-1. (В) Значение IC_{50} комбинации CuO + NAC одинаково и для одной, и для другой клеточной линии.

3.3 Исследование специфичности реакции между CuO и NAC

Дальнейшей задачей было определить специфичность взаимодействия между НЧ CuO и NAC, иными словами, попытаться выявить другие металлы либо антиоксиданты способные давать схожий эффект.

Медь является переходным металлом, что означает, что она может участвовать в окислительно-восстановительных реакциях широкого спектра, таких как реакции по типу Габера-Вейса или Фентона, упомянутые выше. Однако медь не единственный представитель класса переходных металлов. Цинк и железо также относятся к этой категории, поэтому логично предположить, что они будут способны к взаимодействию с NAC тем же образом что и медь. Кобальт и молибден, с другой стороны, являются металлами близкими к меди по биологическому распределению и метаболизму [144, 145].

Проведенные эксперименты показывают, что ни НЧ ZnO, ни НЧ Fe₃O₄ (синтезированные по схеме, описанной в [146]), ни соли других протестированных металлов не проявляют никакого эффекта в сочетании с NAC (рисунок 8). Данный факт свидетельствует о том, что взаимодействие меди и NAC имеет достаточно специфическую природу, и ни железо, ни цинк не могут участвовать в этой реакции, так же, как и кобальт или молибден.

С другой стороны, необходимо было выяснить достаточно ли самого факта наличия меди или же она должна быть определённым образом доступна для взаимодействия. Способна ли, например, медь в составе органического комплекса или соли так же эффективно взаимодействовать с NAC? Результаты данных экспериментов будут представлены ниже.

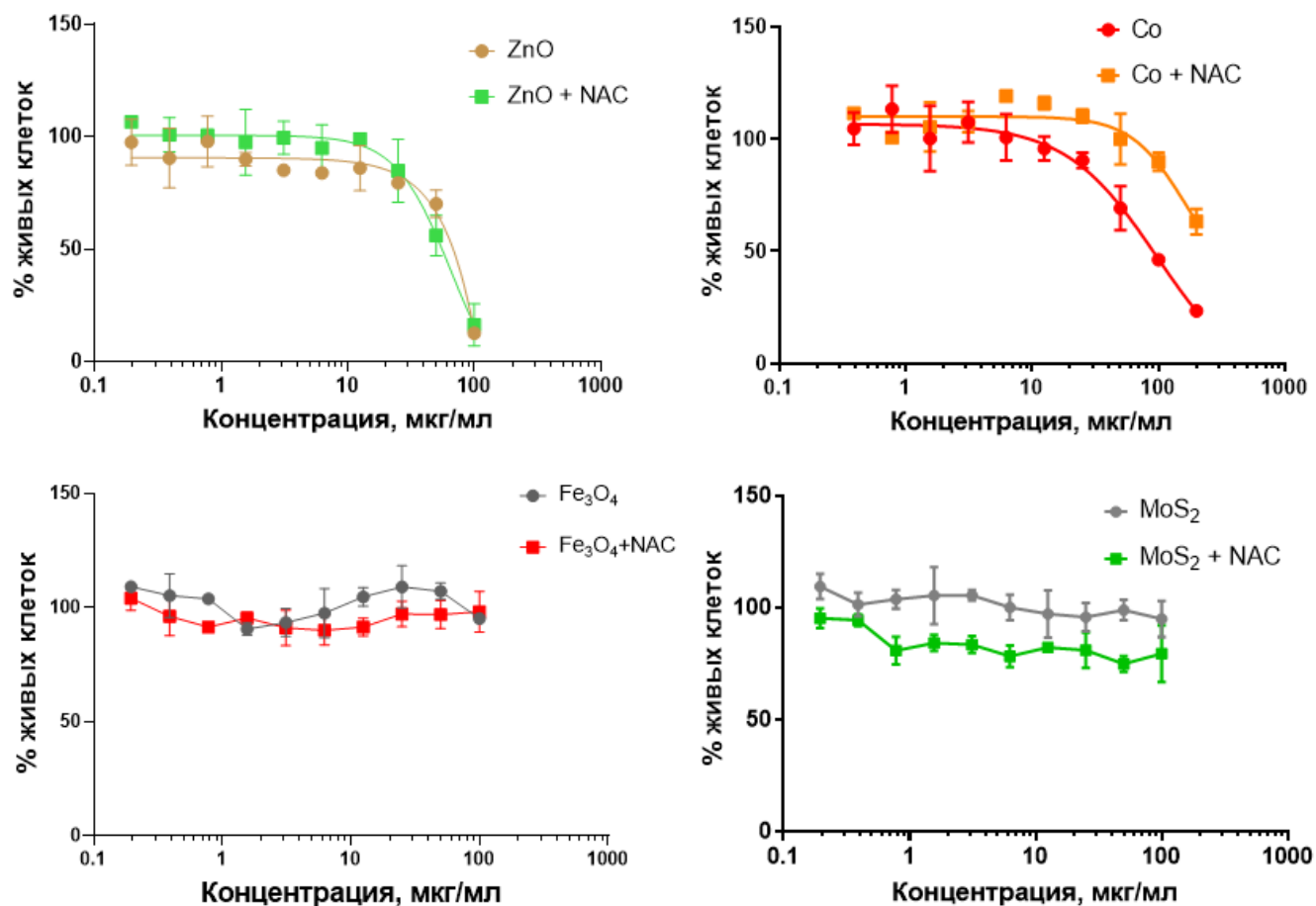


Рисунок 8. МТТ тест с соединениями других переходных металлов вместо НЧ CuO в сочетании с 2,5 мМ NAC.

Ещё одним важным вопросом является определение роли тиоловой группы в процессе протекания реакции и последующего образования АФК. Так как NAC является модифицированной аминокислотой цистеин, мы включили в эксперимент её, а также метионин и фенилаланин, в которых радикал представляет собой атом серы, защищённый метильной группой, и неактивный ароматический остаток, соответственно. Кроме того, были проведены эксперименты с использованием других антиоксидантов (аскорбат и токоферол), которые могут иметь схожие с N-ацетилцистеином свойства.

Среди протестированных аминокислот только цистеин проявляет тот же эффект, что и NAC (рисунок 9). Эти данные указывают на то, что SH-группа действительно играет важную роль во взаимодействии с медью. Аскорбиновая кислота (витамин С) также способна усиливать цитотоксичность наночастиц оксида меди, по-видимому, данный эффект не зависит от наличия SH-группы в

соединении, а обусловлен процессом восстановления ионов меди, о чем подробнее будет рассказываться ниже. Несмотря на это, токоферол, который также обладает антиоксидантной и восстановительной активностью, не усилил цитотоксичность НЧ CuO, что может объясняться его слабой растворимостью в воде, так как этот антиоксидант нацелен на устранение перекисного окисления липидов, а потому хорошо растворим именно в них.

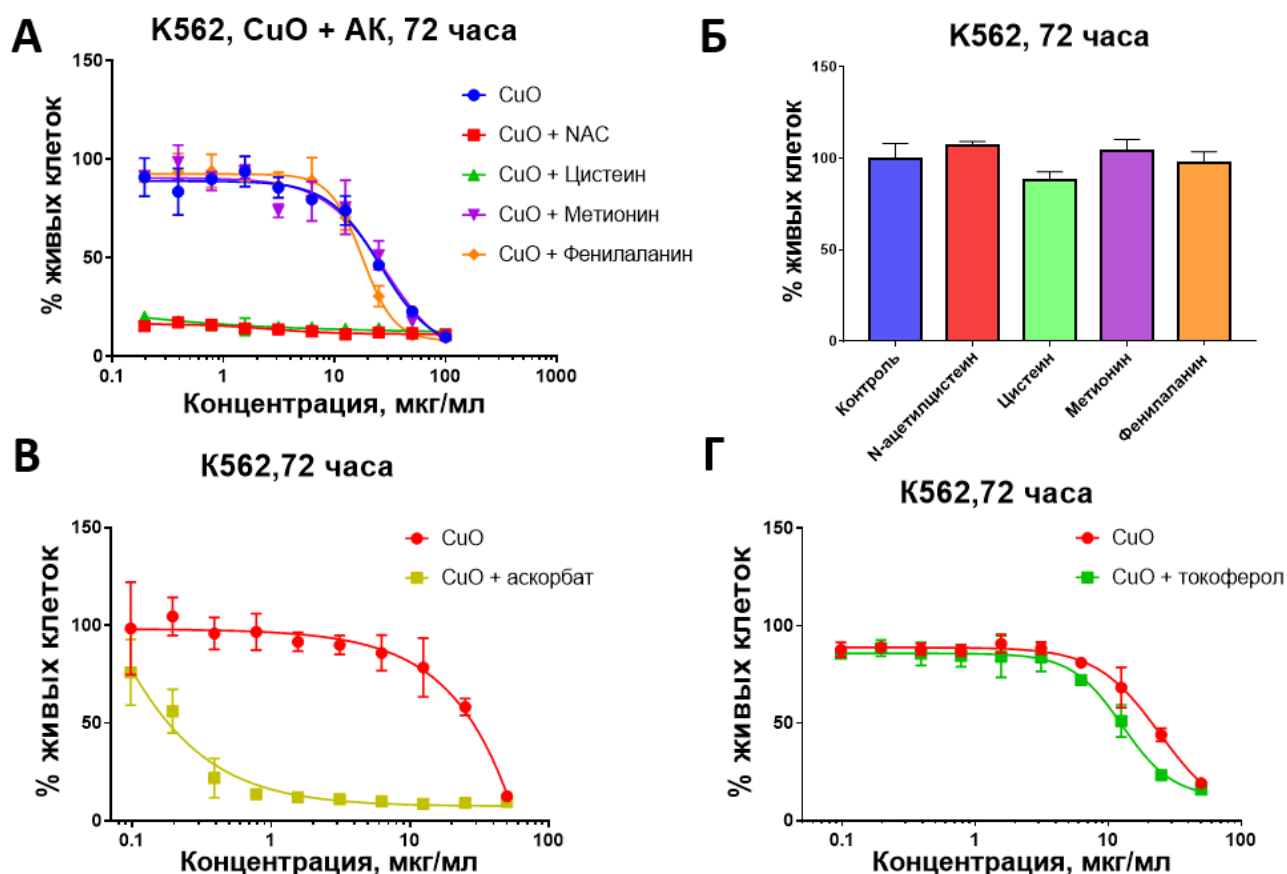


Рисунок 9. МТТ-тест с комбинацией НЧ CuO и различных аминокислот или антиоксидантов. (А) Цитотоксичность НЧ CuO в комбинации с NAC, цистеином, фенилаланином и метионином (2,5 мМ каждый). (Б) Отсутствие цитотоксичности аминокислот самих по себе. (В-Г) МТТ-тест с комбинацией наночастиц оксида меди и витамина С или витамина Е.

3.4 Исследование параметров клеточной гибели

3.4.1 Определение времени гибели

После выявления эффективных концентраций действующих веществ, следующим шагом было определение времени наступления клеточной гибели.

Так как предполагалось, что механизм цитотоксического действия реализуется через генерацию АФК, ожидалось увидеть довольно скорую гибель клеток. Для подтверждения гипотезы клетки K562 обрабатывались НЧ CuO (100 нг/мл) и NAC (2,5 мМ) в комбинации и брались на анализ каждый час. Для определения количества мертвых клеток проводилось окрашивание красителем пропидия иодидом с последующей визуализацией и подсчётом мертвой клеточной фракции на проточном цитофлуориметре. График с динамикой выживания (рисунок 10) демонстрирует, что гибель клеток происходит довольно быстро, так что уже через 9 часов после добавления комбинации остаётся менее 25% клеток, не окрашенных красителем. Быстрая клеточная гибель может указывать на окислительный стресс как её причину.

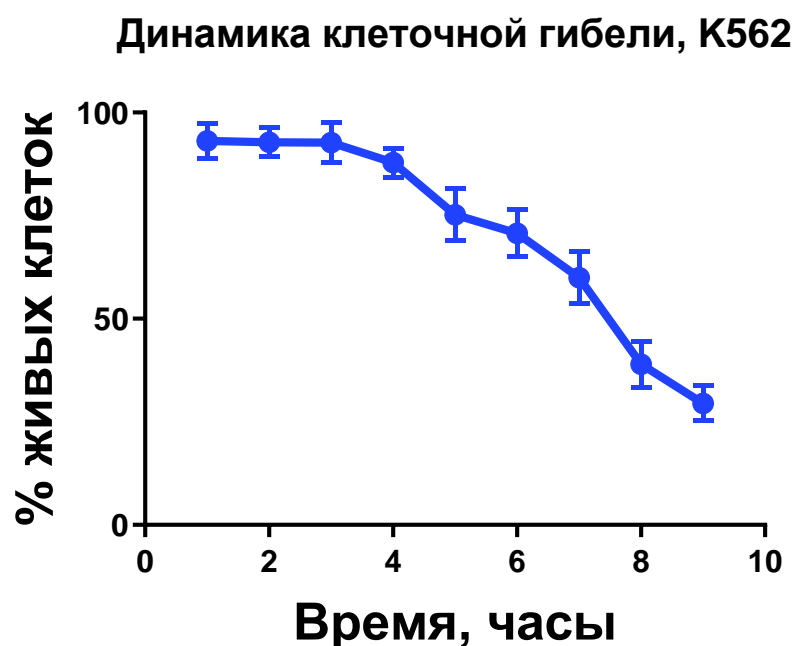


Рисунок 10. Динамика гибели клеток после воздействия комбинации (НЧ CuO (100 нг/мл) и NAC (2,5 мМ)). Процент живых клеток отражает относительное количество клеток, не окрашенных пропидия иодидом спустя обозначенное на оси X время. Эксперимент на культуре клеток проводился в трех повторностях. Данные представлены в виде средней величины \pm стандартная ошибка среднего (СОШ).

3.4.2 Клеточная гибель провоцируется окислительным стрессом

Для того, чтобы определить напрямую наличие окислительного стресса был проведён эксперимент по измерению уровня внутриклеточных АФК при помощи окрашивания красителем CM-H₂DCFDA. Данный краситель пассивно диффундирует внутрь клеток, где, расщепляясь образует соединение, которое не может диффундировать наружу. При взаимодействии с внутриклеточными АФК образуется флуоресцирующее производное, которое можно обнаружить при помощи проточного цитофлуориметра. В эксперименте клетки K562 предварительно инкубировали с красителем в течение 1 часа, а затем подвергали воздействию НЧ CuO (1 мкг/мл) и NAC (2,5 мМ) в комбинации или по отдельности. H₂O₂ в конечной концентрации 5 мМ использовали в качестве положительного контроля.

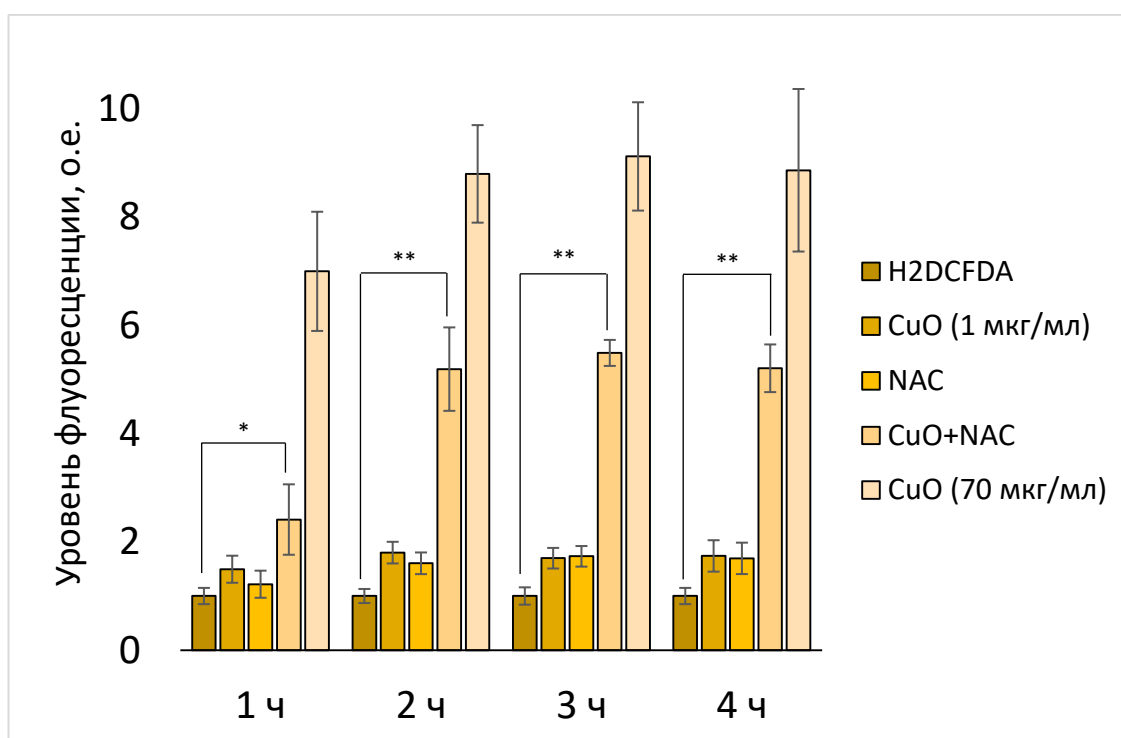


Рисунок 11. Относительный уровень флуоресценции проб, взятых для анализа по обнаружению АФК с помощью CM-H₂DCFDA. Уровень флуоресценции считался как частное медианного значения уровня флуоресценции пробы от медианного значения уровня флуоресценции пробы с красителем. Эксперимент на культуре клеток проводился в трех повторностях. Данные представлены в виде средней

величины \pm стандартная ошибка среднего (СОШ). Различия между выборками определялись по критерию Манна-Уитни

Как показано на рисунке 11, значительное образование АФК наблюдается после 2 часов инкубации с комбинацией, в то время как окислительно-восстановительный баланс проб с НЧ CuO или NAC по-отдельности остаётся стабильным. Эти данные согласуются с предыдущим экспериментом. Клеточная гибель видна на четвертый час после добавления комбинации и через два часа после подъёма уровня АФК.

3.4.3 Комбинация наночастиц CuO и NAC способствует изменению активности митохондрий

Митохондрии – одни из важнейших органелл внутри клетки, что связано не только с их ролью в метаболизме клеток и выработке энергии, но также с участием в развитии клеточной гибели по механизму апоптоза. Морфология митохондрий довольно вариативна и динамична и во многом зависит от состояния клетки. Стрессовые условия способствуют изменению организации митохондриальной сети, разобщению митохондрий, оформлению отдельных органелл, концентрации их вблизи ядра.

В данном исследовании изменение морфологии митохондрий определялось при помощи окрашивания красителем DHR 123 (жёлтый). Окрашивание ядер проводилось красителем Hoechst 33258 (синий). Для эксперимента брались клетки HCT116. Результаты представлены на рисунке 12. В необработанных клетках митохондрии, окрашенные DHR 123, визуализировались как отчётливые цилиндрические структуры (рисунок 12, верхняя левая панель). В отличие от этого, обработка комбинацией НЧ CuO и NAC в течение всего 15 мин приводила к потере упорядоченной структуры митохондрий; при более длительном воздействии комбинации митохондрии обнаруживались в основном околядерной области. К 4 часам цитоплазма с митохондриями и ядрами распалась. Интересно, что форма ядер, а также плотность хроматина остались неизменными, что указывает на прямое повреждение цитоплазматического содержимого

комбинацией НЧ CuO и NAC. Для сравнения, лазерное освещение клеток, нагруженных контрольным соединением фотолоном (Pht), производным хлорина еб, привело к значительному повреждению цитоплазмы (особое внимание стоит обратить на скопления фрагментированных органелл и значительное уменьшение флуоресценции DHR на рисунке 12, вверху по центру). Ни CuO, ни NAC в моно воздействии не индуцировали похожих митохондриальных изменений.

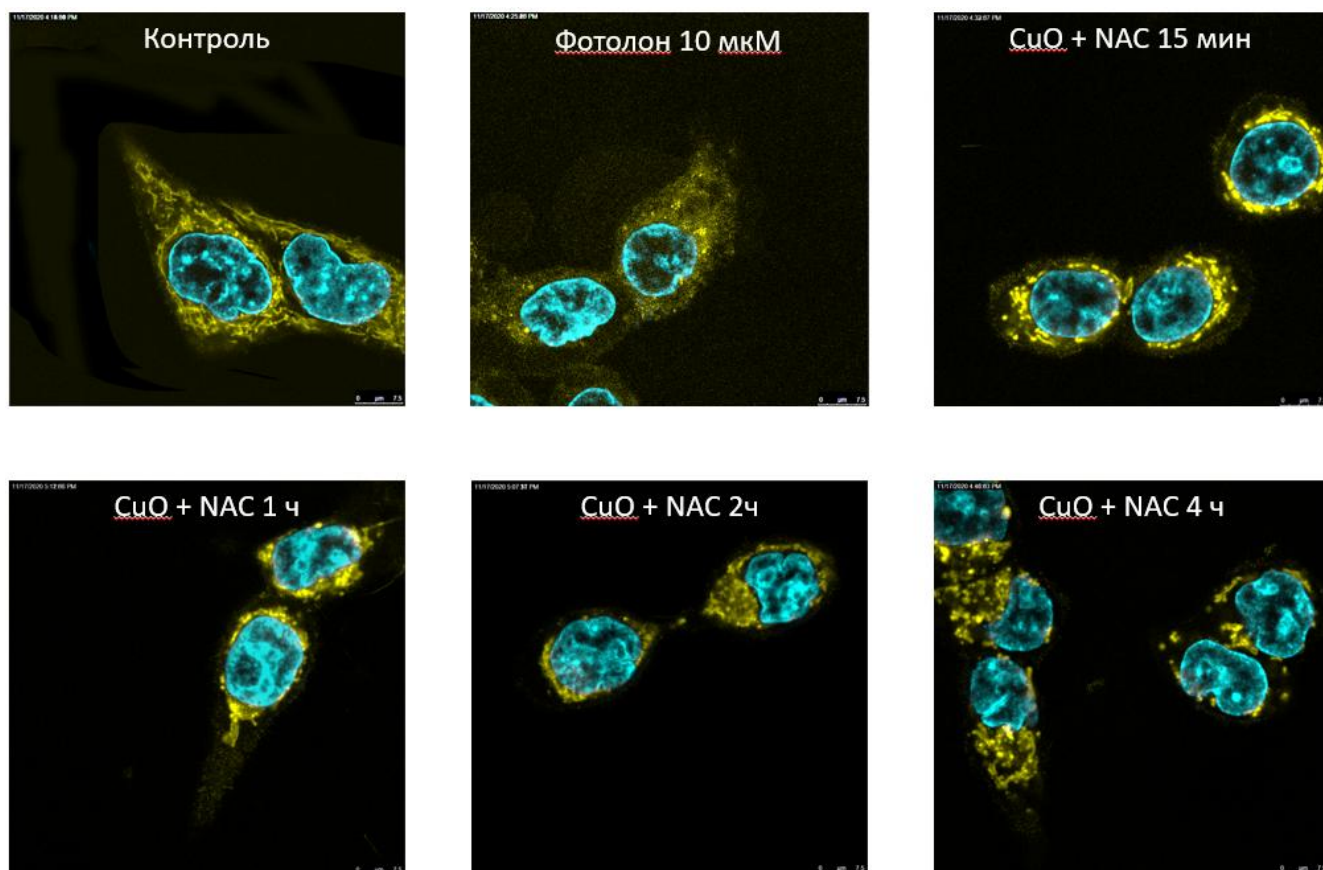


Рисунок 12. Клетки мечены индикатором АФК DHR 123 (желтый) и ядерным красителем Hoechst 33258 (синий) и проанализированы с помощью лазерной конфокальной микроскопии. Pht, фотолон.

Также одной из характеристик клеточного стресса и нарушения функционирования митохондрий является падение митохондриального потенциала. Это одно из первых событий апоптоза, после которого начинается высвобождение цитохрома С и реализация каскада каспаз. Измерение митохондриального потенциала позволяет судить о развитии апоптотического или некротического типа гибели.

Эксперимент по измерению митохондриального потенциала выполнялся при помощи проточной цитофлуориметрии согласно следующему протоколу. Клетки K562 обрабатывали НЧ CuO (10 нг/мл) и NAC (2,5 мМ) в комбинации в течение 1, 3 и 24 часов. PF-114 использовался в качестве положительного контроля как индуктор апоптоза. После инкубации клетки отмывали от среды центрифугированием и добавляли раствор PBS, содержащий 85 нМ красителя MitoTracker. Митохондриальный потенциал начал снижаться после 1 часа инкубации с комбинацией (рисунок 13). Это доказывает, что митохондрии как уязвимые органеллы немедленно реагируют на АФК, генерируемые комбинацией. Через 6 часов клетки разделились на две популяции: мертвые клетки со сниженным митохондриальным потенциалом и живые с неизменным митохондриальным потенциалом, что вписывается в общую картину динамики клеточной гибели.

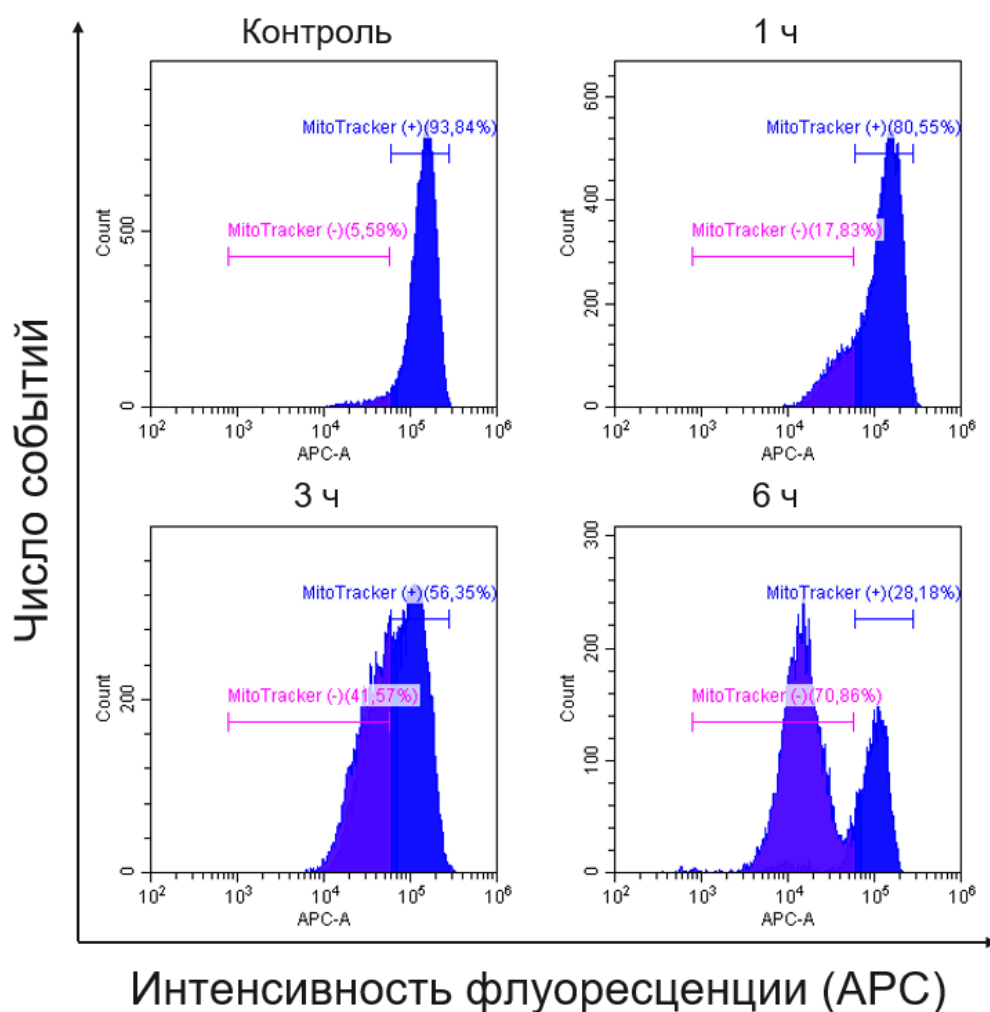


Рисунок 13. Измерение митохондриального потенциала с помощью красителя MitoTracker (85 нМ) после добавления комбинации НЧ CuO (10 нг/мл) и NAC (2,5 мМ) к клеткам K562.

3.4.4 Обнаружение признаков апоптотической гибели

Поскольку клетки умирают в течение нескольких часов после воздействия комбинации НЧ CuO с NAC, предполагалось, что возможным механизмом гибели клеток является некроз. Одним из наиболее часто используемых методов для дифференциации апоптотического или некротического типа гибели является двойное окрашивание Аннексин V-FITC/пропидий иодид. Аннексин – небольшой белок с высоким сродством к фосфотидилсерину, который появляется на внешней мембране клеток как одно из событий в процессе развития апоптоза. В то же время пропидия иодид способен связаться с ДНК и окрасить клетку лишь в случае наличия в плазматической мембране пор, которые появляются на поздних этапах гибели и являются признаком некроза.

После 4 часов инкубации с CuO + NAC (рисунок 14А) количество положительных событий в канале флуоресценции FITC увеличивается, что соответствует окрашенным Аннексином клеткам. В то время как количество положительных событий в канале PE (фикоэритрин) сравнимо с контрольной группой, что указывает на то, что популяция находится в апоптозе. После 6 часов инкубации с комбинацией почти все клетки являются FITC-положительными, и часть популяции смещается в квадрант, соответствующий окрашиванию по обоим красителям (рисунок 14Б). Наконец, 24 часа инкубации с CuO + NAC привели к гибели всей популяции клеток или переходу их в стадию «полного» апоптоза, что соответствует свечению событий в каналах обоих красителей (рисунок 14В). Всё это указывает на то, что в этом случае может происходить активация апоптотических каскадов.

Чтобы косвенно подтвердить это предположение, был использован пан-каспазный ингибитор Z-VAD (Sigma-Aldrich) в концентрации 50 мкМ. Несмотря

на добавление Z-VAD никаких изменений в развитии клеточной гибели не наблюдалось, что заставляет усомниться в наличии апоптоза.

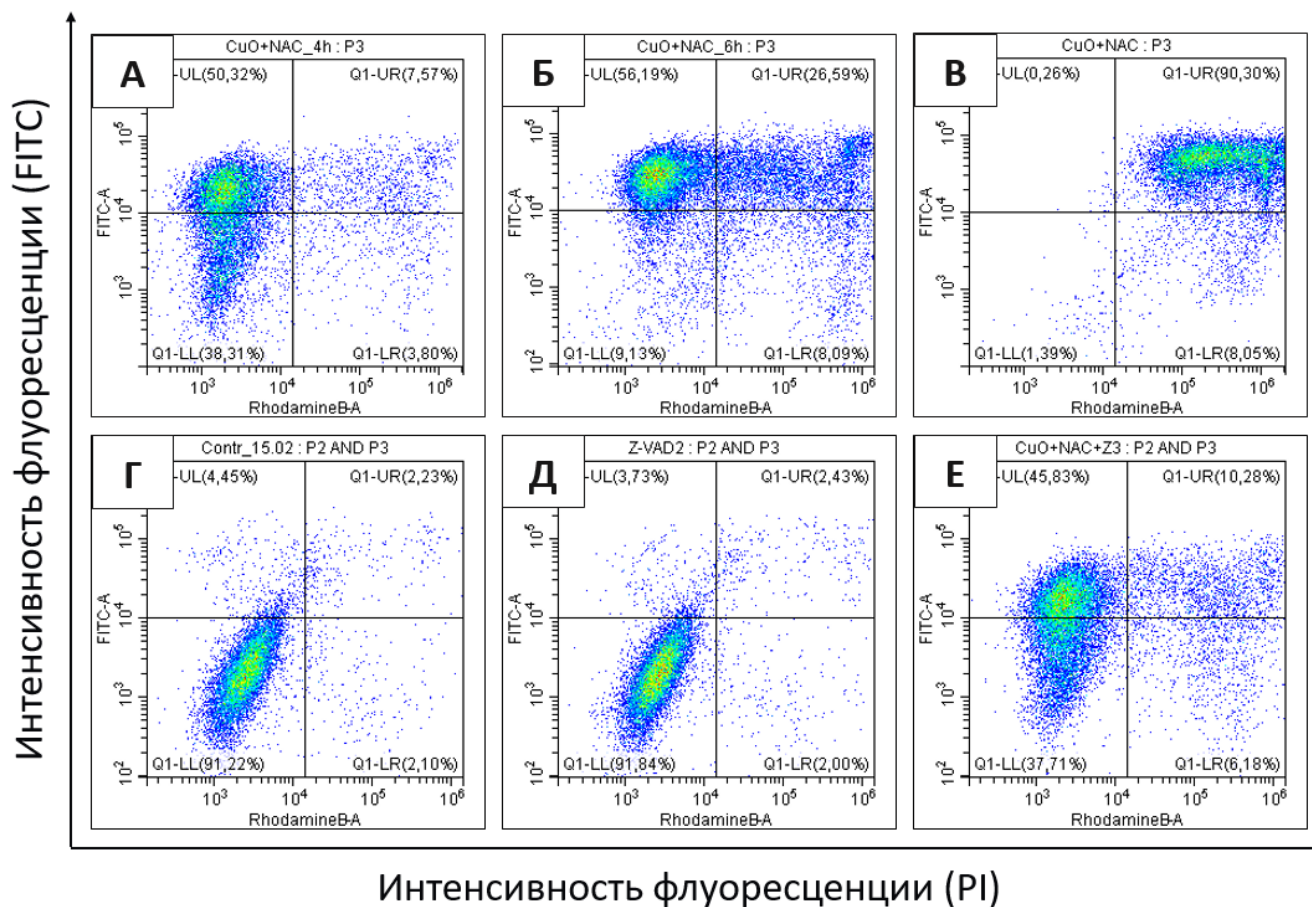


Рисунок 14. Окрашивание аннексином V/PI. (А-В) Клетки, обработанные НЧ CuO (27 нг/мл) и NAC (2,5 мМ) в комбинации в течение различных периодов времени: (А) 4 часа, (Б) 6 часов, (В) 24 часа. (Г) Необработанные контрольные клетки. (Д) Клетки, обработанные Z VAD (50 мкМ). (Е) Клетки, предварительно обработанные Z-VAD (50 мкМ) и обработанные комбинацией НЧ CuO + NAC в течение 4 часов. Нижний левый квадрант соответствует живым необработанным клеткам, верхний левый – клеткам в апоптозе (окрашены только по аннексину), верхний правый – клетки в стадии позднего апоптоза/некроза (окрашены двумя красителями). Эксперимент на культуре клеток проводился в трех повторностях, на рисунке представлен репрезентативный пример.

3.4.5 Комбинация способна влиять на клеточный цикл клеток MDA-MB-231 и HCT116

Успешное прохождение фаз клеточного цикла является одним из важных показателей физиологического благополучия клеточной популяции. Нарушения клеточного цикла сопровождаются применением различных химиотерапевтических соединений, так доксорубин вызывает остановку цикла в фазе G2 из-за того, что повреждения ДНК не дают клеткам начать деление. Апоптотическая гибель клеток сопровождается фрагментацией ДНК, которая при анализе видна как дополнительная фаза слева от остальных, называемая subG1-фазой, так как количество ДНК в апоптотических тельцах меньше диплоидного набора.

Анализ клеточного цикла проводили, используя метод окрашивания ДНК пропидия иодидом в лизирующем буфере, упомянутом выше. НЧ CuO и NAC в комбинации и по отдельности добавляли к клеткам K562. Далее проводили инкубации в течение 6-ти или 24-х часов и добавляли буфер, содержащий PI, RNКазу A и NP-40. Результаты эксперимента позволяют сделать вывод о том, что комбинация CuO + NAC не изменяет распределение фаз клеточного цикла клеток K562 (рисунок 15, 16). Это подтверждает наш вывод о некротической природе механизма гибели клеток. Клетки просто умирали до того, как могли полностью развиться пути апоптоза, что не приводило к расщеплению ДНК с последующим появлением событий subG1. Распределение фаз также не изменилось, что указывает на то, что АФК, генерируемые комбинацией, не обладают цитостатическим эффектом и не блокируют клеточный цикл ни в одной из контрольных точек.

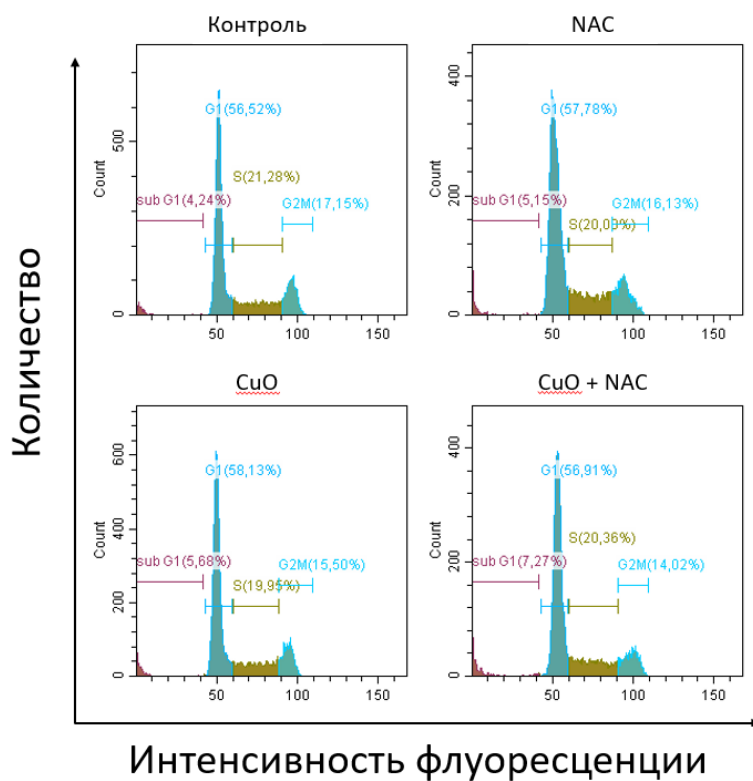


Рисунок 15. Распределение фаз клеточного цикла клеточной культуры K562 спустя 6 часов после добавления НЧ CuO – 45 нг/мл и NAC – 2,5 мМ.

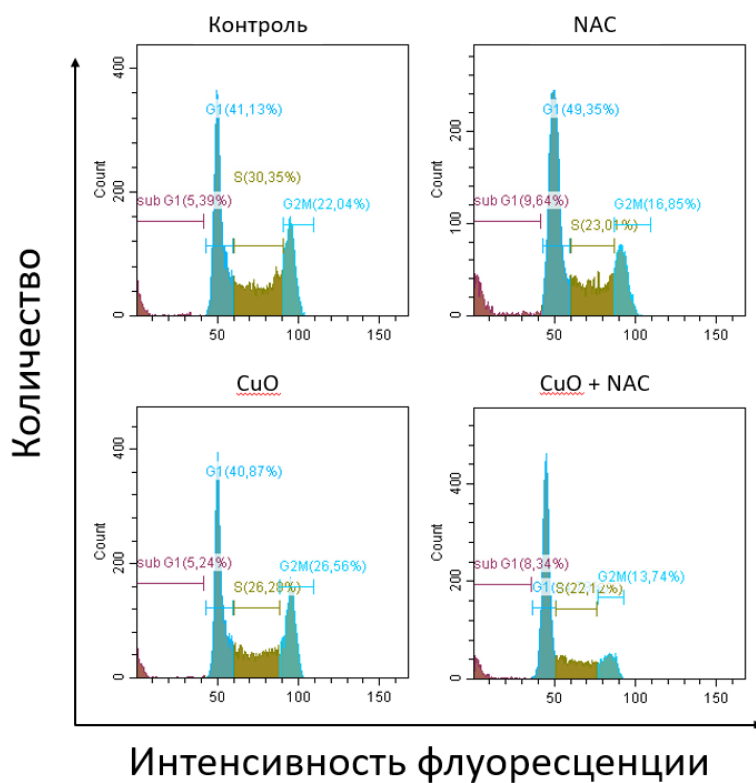


Рисунок 16. Распределение фаз клеточного цикла клеточной культуры K562 спустя 24 часа после добавления комбинации. Концентрация CuO – 45 нг/мл, NAC – 2,5 мМ.

Однако ситуация будет несколько иной, если мы возьмем для анализа адгезионные клетки (рисунок 17). Клеточный цикл клеток MDA-MB-231 и НСТ116 изменяется при добавлении комбинации НЧ CuO и NAC. Фаза subG1 увеличивается по ходу эксперимента, а G1 уменьшается.

Это наблюдение дает представление не только о возможном механизме гибели клеток, но и о цитостатических свойствах комбинации, поскольку фаза G2 стабильна или увеличивается во время инкубации. Предыдущее исследование [110] было также выполнено на линиях адгезионных клеток, что может говорить о тканеспецифических эффектах комбинации.

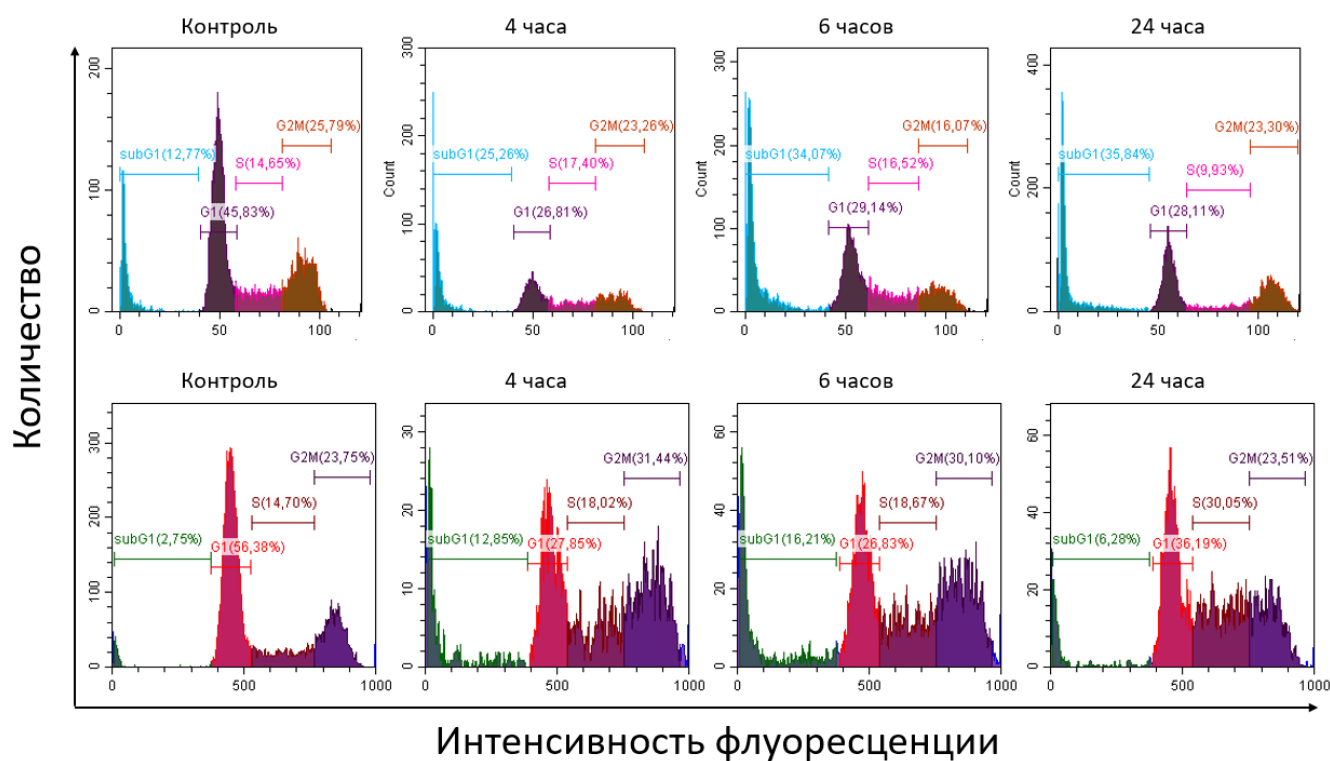


Рисунок 17. Анализ клеточного цикла для линий адгезионных клеток. (А-Д) НСТ-116. (Е-Н) MDA-MB-231. (А, Е) Контрольные клетки. (В, F) Зонды, обработанные комбинацией CuO (0,1 мкг / мл) и NAC (1 мМ) в течение 4 часов, (С, G) в течение 6 часов. (Д, Ч) на 24 часа.

Для лучшей интерпретации результатов была построена гистограмма с накоплением (рисунок 18), на которой также заметны описанные выше эффекты.

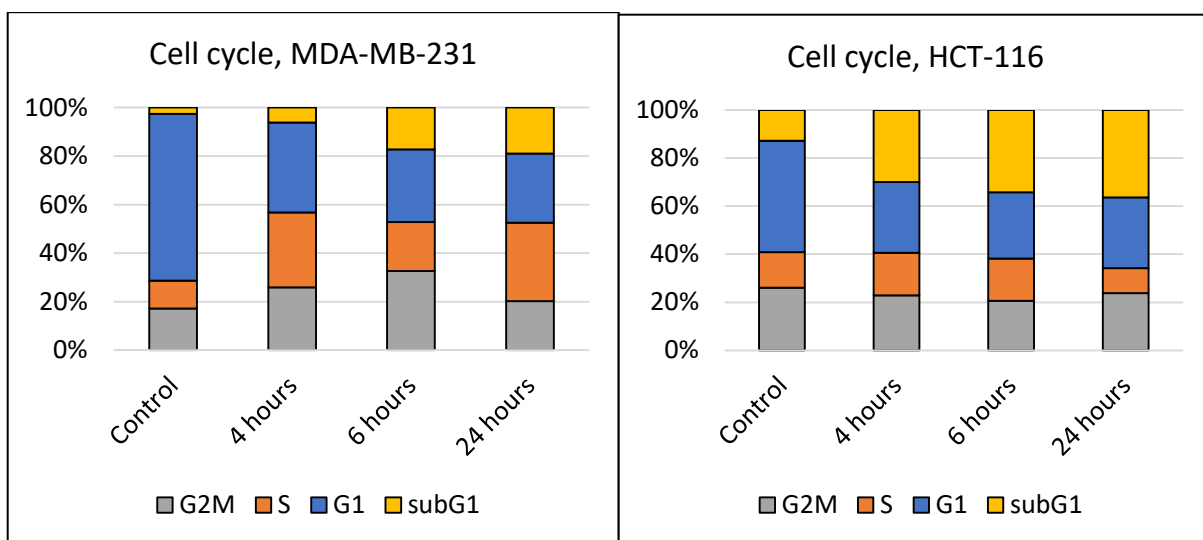


Рисунок 18. Диаграмма с накоплением, отражающая распределение фаз клеточного цикла для клеточных культур MDA-MB-231 и HCT116.

3.4.6 Комбинация НЧ СиО и N-ацетилцистеина не вызывает активацию классических апоптотических путей или некроптоза

Изменения в клеточном цикле, а также окрашивание аннексин/пропидием могут указывать на индукцию апоптоза, однако, имеющиеся противоречия не позволяют однозначно определить механизм гибели. Наличие активированной формы апоптотических белков, например, расщепленной каспазы-3 или PARP является наиболее надежным признаком наличия апоптоза. В наших экспериментах мы выполнили детекцию этих белков при помощи иммуноцитохимического окрашивания с проточной цитофлуориметрией и методом вестерн блота.

Результаты иммуноцитохимии приведены на рисунке 19, на них заметно, что расщепленная форма каспазы 3 или PARP не появляется ни через 6, ни через 24 часа инкубации. PF-114 (20 нМ) представляет собой специфический ингибитор BCR-Abl, который использовался в этом эксперименте в качестве положительного контроля. Гибель клеток, индуцированная PF-114, требует больше времени, чем гибель клеток, индуцированная комбинацией, таким образом, инкубация с ингибитором составляла 48 часов вместо 6 или 24 часов для комбинации.

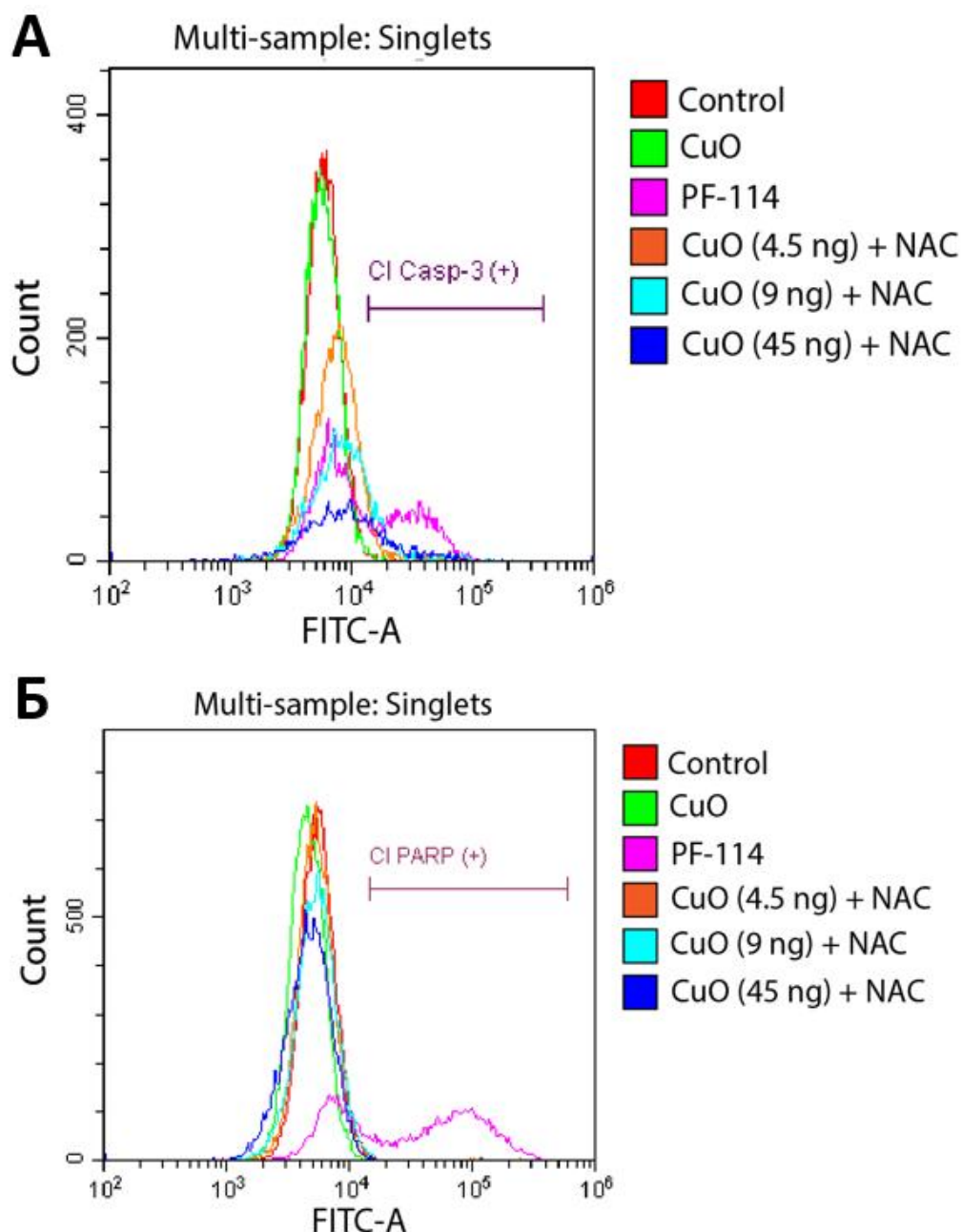


Рисунок 19. Иммуноокрашивание процессированных (протеолитическое расщепление=активация) каспазы-3 (А) и PARP (Б) через 24 часа инкубации с комбинацией НЧ CuO и NAC (2,5 мМ). Признаков активации каспазы-3 или расщепления PARP не обнаружено.

Так как иммуноцитохимический метод не всегда является чувствительным нами было решено дополнительно подтвердить его результаты при помощи иммуноблоттинга. Результаты, представленные на рисунке 20, позволяют сделать вывод об отсутствии расщепления каспазы-3 (т.е. ее каталитической активации) после добавления комбинации CuO + NAC при наличии таковой в пробе с

положительным контролем (доксорубицин). Это говорит о том, что механизм классического апоптоза не задействуется в реализации клеточной гибели индуцированной комбинацией. Наличие небольших количеств расщеплённого PARP может являться артефактом эксперимента либо же последствиями реализации другого механизма гибели, отличного от апоптоза.

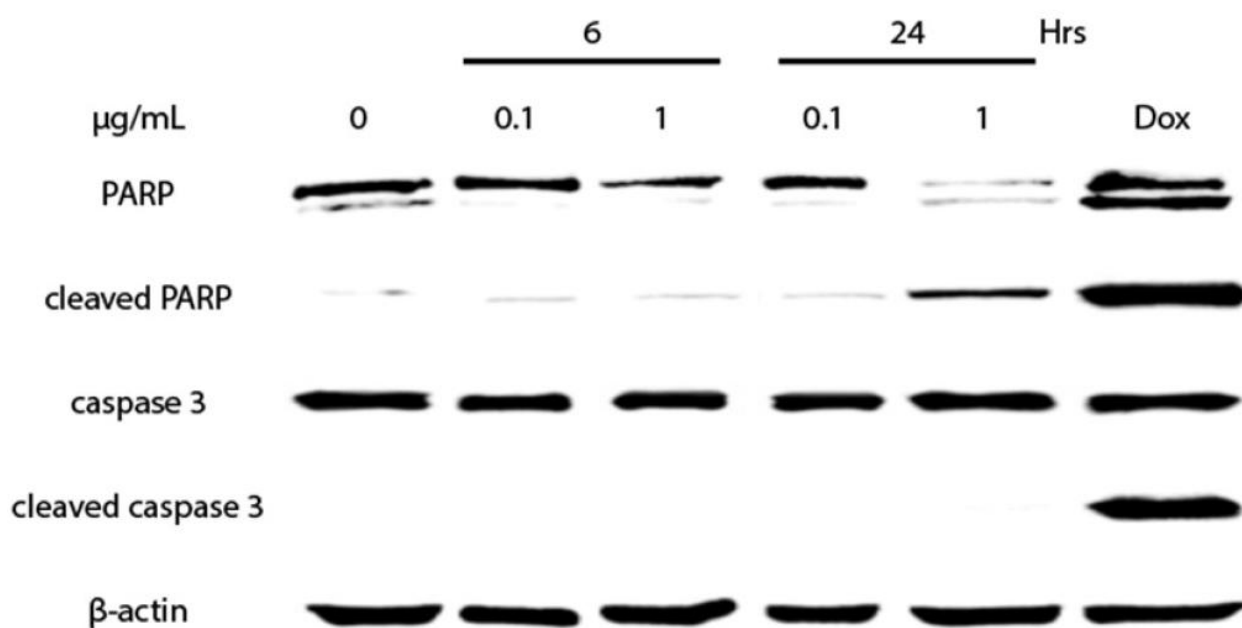


Рисунок 20. Вестерн блот на расщеплённый PARP и каспазу-3 после добавления комбинации или доксорубицина (в качестве контроля). Числа вверху соответствуют использованной концентрации наночастиц оксида меди, концентрация NAC была стабильной и составляла 2,5 мМ. Концентрация доксорубицина – 200 нМ.

Как уже было упомянуто, приведенные выше изменения клеточного цикла для клеточных культур MDA-MB-231 и HCT116 могут указывать на тканеспецифичность действия комбинации, поэтому было решено выполнить вестерн блот и для этих клеток. Несмотря на изменения в распределении фаз клеточного цикла, расщепленные формы обоих белков не появились в эксперименте с клетками MDA-MB-231 (рисунок 21).

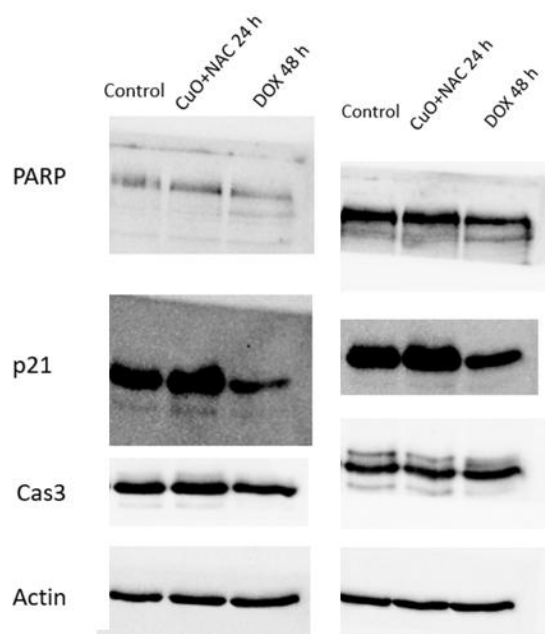
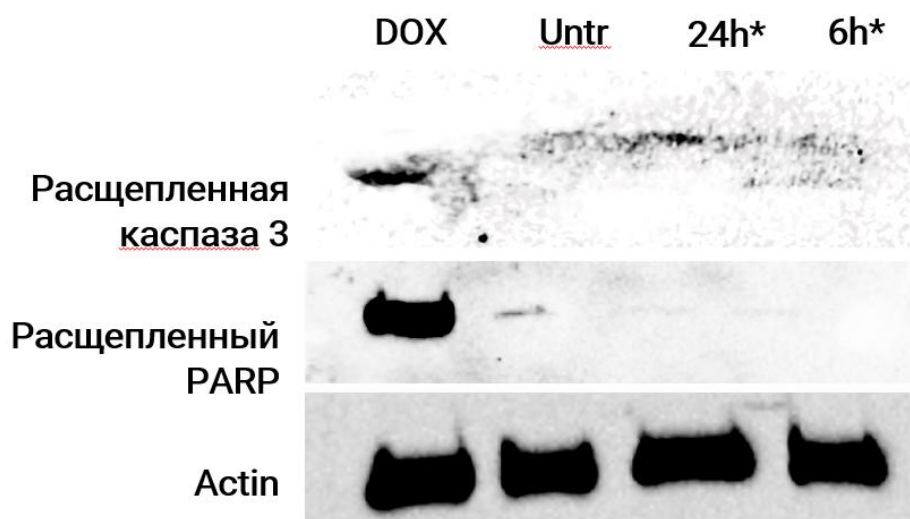


Рисунок 21. Вестерн-блоттинг клеток MDA-MB-231 (слева) и K562 (справа). Комбинация НЧ CuO (100 нг/мл) + NAC (2,5 мМ) была добавлена за 24 часа до лизиса клеток для выделения белков.

Наличие индуцированных каспазы-3 и PARP не удалось выявить и в клетках НСТ116 (рисунок 22). Это подтверждает, что наша гипотеза о наличии апоптоза в адгезионных клетках при добавлении комбинации ошибочна.



*DG-2FSMe-k-Ac (10 μ M) + NAC (2.5 mM)

Рисунок 22. Вестерн-блоттинг для клеток НСТ116. Комбинация НЧ CuO (100 нг/мл) + NAC (2,5 мМ) была добавлена за 24 часа до лизиса клеток для выделения белков.

Так как признаки клеточной гибели соответствуют одновременно и апоптозу и некрозу, нами было решено проверить не является ли механизмом гибели некроптоз, то есть программируемая некротическая гибель клетки.

Некроптоз возможно предотвратить использованием ингибиторов взаимодействующей с рецептором протеинкиназы-1 (receptor-interacting protein kinase 1, RIPK1) или -3. Нами было решено попытаться применить некростатин-1 ингибитор RIPK1 для блокирования некроптоза, чтобы доказать реализацию именно этого типа гибели при добавлении комбинации НЧ CuO и NAC. Клеточная культура хронического миелоидного лейкоза была предобработана некростатином-1 за 1 час до добавления комбинации. Ожидалось увидеть различия в значениях IC_{50} для клеток предобработанных некростатином и без него, однако, различий не было (рисунок 23). Эти результаты позволяют сделать вывод об отсутствии активации сигнальных путей некроптоза при добавлении комбинации.

Другим возможным механизмом гибели может являться ферроптоз, однако токоферол не предотвращал гибель клеток (рисунок 9Г), что означает, что перекисное окисление липидов приводит к другой форме гибели клеток. Что касается всех результатов, мы можем сделать вывод, что наиболее вероятным механизмом гибели клеток, вызванной генерацией АФК, при добавлении комбинации НЧ CuO и NAC может быть некроз.

К562, 72 часа

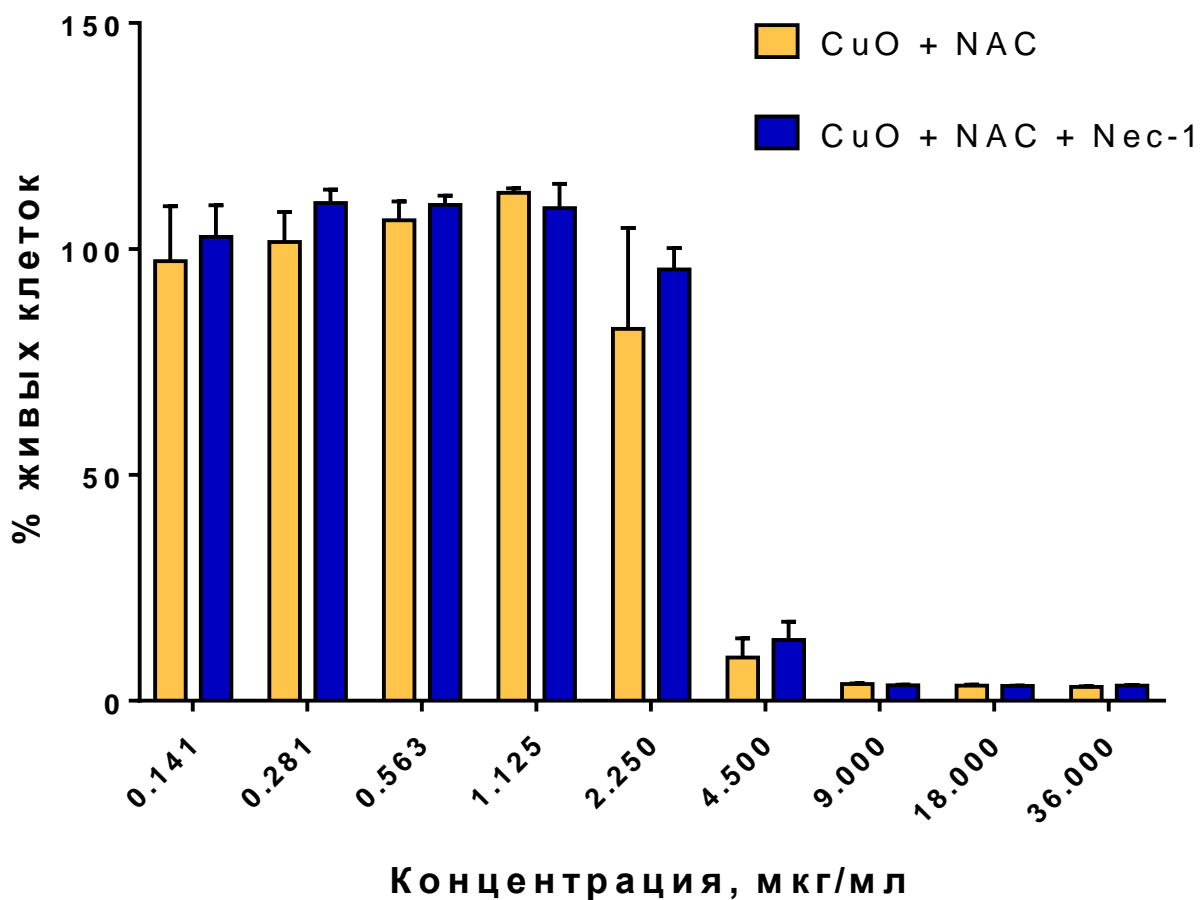


Рисунок 23. Сравнение жизнеспособности клеток в присутствии или в отсутствие некростатина-1 (Nec-1) при воздействии CuO + NAC.

3.5 Наночастицы CuO обладают низкой способностью проникать внутрь клетки

Противоречивые результаты экспериментов с окрашиванием аннексин/пропидием и определением индукции проапоптотических маркеров натолкнули нас на мысль о преимущественном воздействии комбинации на цитоплазматическую мембрану клетки. Была высказана гипотеза о том, что наночастицы могут иметь слабую способность проникать внутрь клетки, из-за чего окислительный стресс развивается не изнутри, а снаружи, что могло бы объяснить наблюдаемые эффекты.

Атомно-адсорбционная спектрофотометрия использовалась для измерения количества внутриклеточной меди после добавления наночастиц CuO через различные промежутки времени. Результаты представлены на рисунке 24.

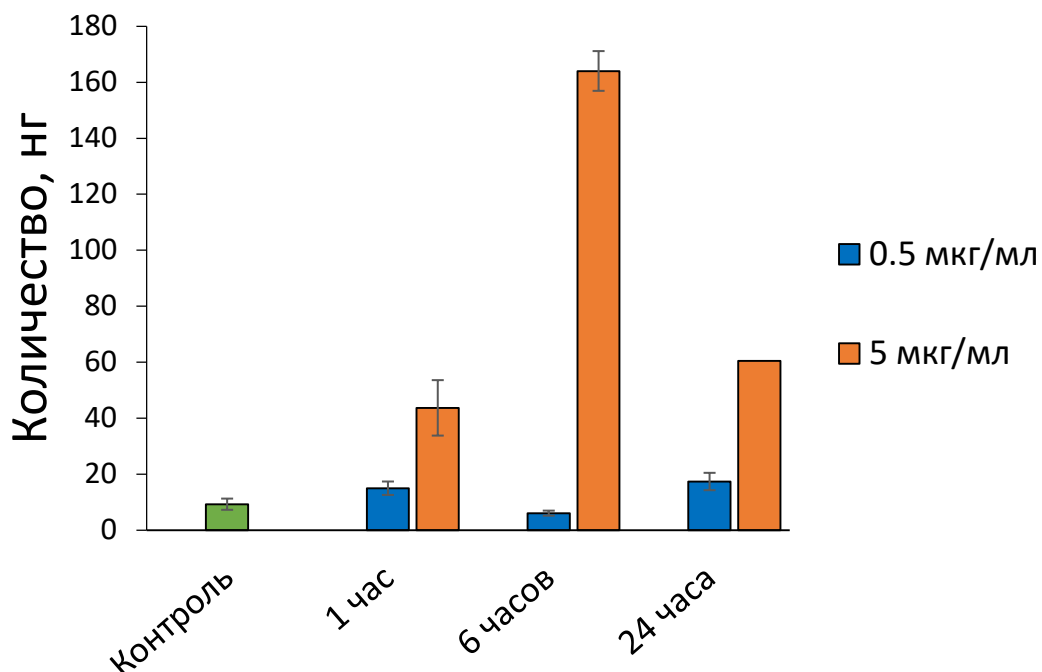


Рисунок 24. Атомно-абсорбционная спектроскопия. Каждый столбец отражает абсолютное количество меди в образце.

Как видно, абсолютное количество меди в образцах, к которым были добавлены наночастицы, значительно превышает количество меди в контроле, однако, это предоставляет мало информации об относительном количестве частиц, попавшем в клетки. Чтобы определить это, мы использовали значения, представленные на рисунке 24 и нашли необходимые соотношения, которые представлены в таблице 4.

Таблица 4. Количество меди, обнаруженное методом атомно-абсорбционной спектроскопии. В скобках указан процент наночастиц, оставшихся в образце.

Концентрация	Время		
	1 час	6 час	24 час
Контроль	9.3 нг		
0.5 мкг/мл	15.0 нг (3%)	6.1 нг (1.2%)	17.4 нг (3.5%)
5 мкг/мл	43.7 нг (0.8%)	164 нг (3%)	60.5 нг (1.2%)

Можно заметить, что в образцах остается лишь небольшая часть наночастиц, максимум 3-4 процента от первоначального количества. Следовательно, скорее всего генерация АФК, вызванная комбинацией наночастиц и НАС, также происходит вне клетки, что согласуется с эффектами, наблюдаемыми нами в экспериментах по выявлению механизма клеточной гибели. Быстрое повреждение мембраны не позволяет запускаться механизмам апоптотической гибели, а также приводит к падению митохондриального потенциала и нарушению распределения фосфолипидов в бислое, что мы видим при окрашивании аннексин/пропидием.

3.6 Комбинация НЧ CuO и НАС изменяет проницаемость искусственных фосфолипидных мембран

Итак, комбинация вызывает быструю клеточную гибель без активации апоптотических каскадов, при этом количество внутриклеточной меди практически не увеличивается, что может указывать на то, что АФК образуются во внеклеточном пространстве и оказывают повреждающее влияние на плазматическую мембрану, приводя к окислению фосфолипидов и нарушению её проницаемости. Чтобы подтвердить негативное влияние комбинации на структуру мембран была выбрана модель формирования бислойных липидных мембран по методу Монтала и Мюллера. В качестве основы для искусственных мембран были выбраны 1-пальмитоил-2-олеил-sn- глицеро-3-фосфохолин

(ПОФХ) и 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-глицерол) (ПОФГ). Было выяснено, что добавление НАС никак не влияет на проницаемость ПОФХ мембран, однако, провоцирует флуктуации тока в ПОФГ мембранах. Добавление постепенно повышающихся концентраций НЧ CuO во втором случае приводит к разрыву мембраны (Рисунок 25). Это указывает на то, что действие комбинации сильнее проявляется в отношении отрицательно заряженных мембран. Так как плазматическая мембрана живых клеток сложена из фосфолипидов различного состава, комбинация может работать против тех, что имеют отрицательно заряженные остатки в своём составе. Данная цепь событий вызывает реакцию, приводящую к гибели клеток по некротическому пути.

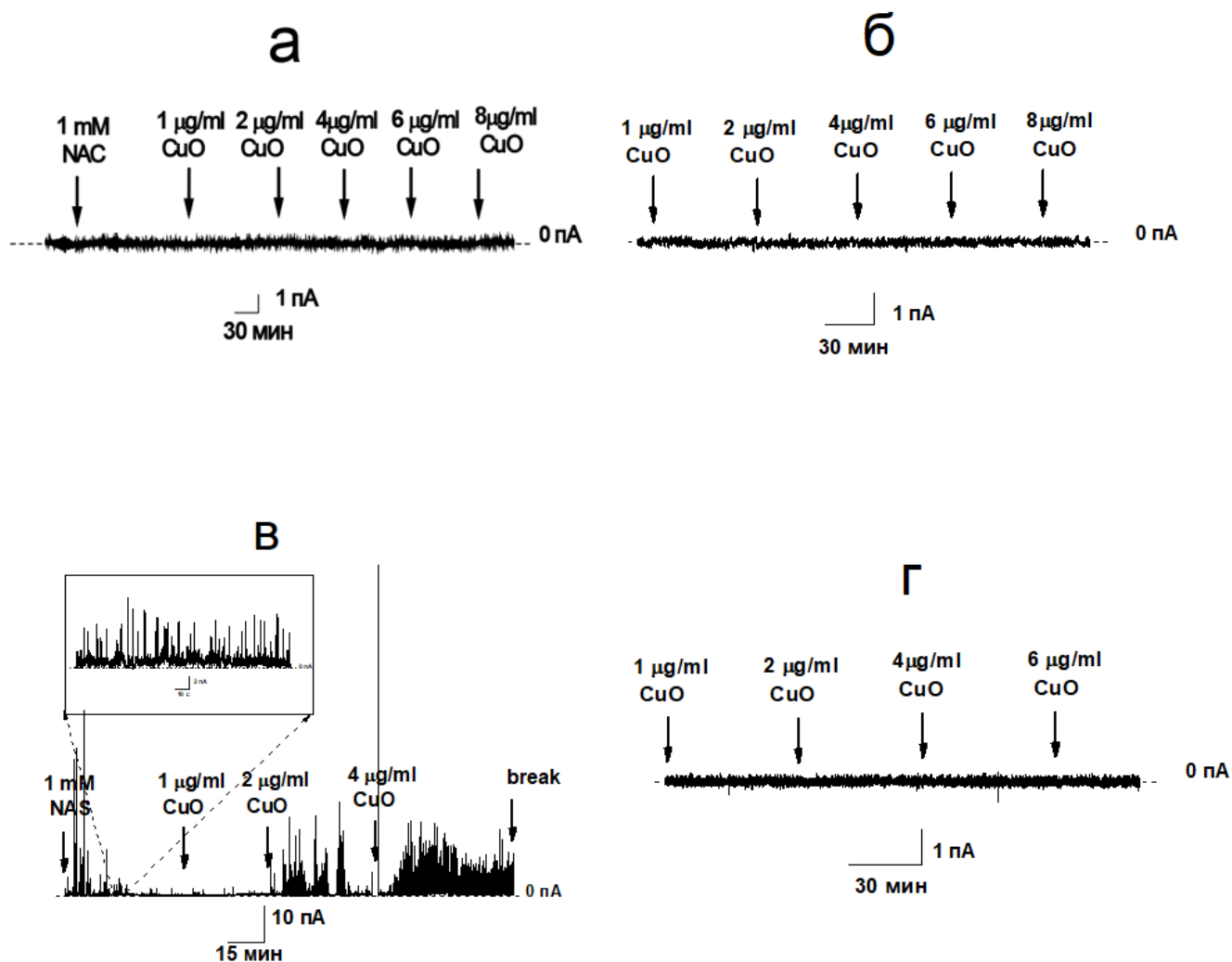


Рисунок 25. Записи флуктуаций трансмембранных токов, протекающих через липидные бислои, модифицированные 2,5 мМ НАС в отсутствие и в присутствии наночастиц из CuO в концентрациях 1, 2, 4, 6 и 8 мкг/мл (а, в). Независимое

введение в мембраноомывающие растворы наночастиц из CuO в концентрациях 1, 2, 4, 6 и 8 мкг/мл (б, г). Момент введения агента указано на рисунке над стрелками. Мембраны сформированы из ПОФХ (а, б) и ПОФГ (в, г) и омываются 0.1 М KCl, 5 mM HEPES, pH 7,4. Трансмембранное напряжение составляет 50 мВ.

3.6.1 Измерение утечки флуоресцентного красителя из больших везикул в присутствии NAC и наночастиц из CuO

Исследована зависимость утечки флуоресцентного маркера кальцеина из моноламеллярных липосом, сформированных из ПОФХ или ПОФГ, в присутствии NAC, наночастиц CuO и их комбинации. Видно, что отдельно 2,5 mM NAC и наночастиц CuO в концентрациях 1, 2 и 4 мкг/мл, а также их комбинация (рисунок 26) практически не влияют на утечку кальцеина из ПОФХ везикул: максимальная величина утечки составляет 6%. В случае ПОФГ-липосом максимальная величина утечки в присутствии 2,5 mM NAC составляет 18%, а дальнейшая добавка в систему наночастиц CuO в концентрациях 1, 2 и 4 мкг/мл IF достигает до 24%. Отдельно введенные наночастицы CuO в концентрациях 1, 2 и 4 мкг/мл практически не влияют на утечку кальцеина из ПОФГ (максимальная утечка кальцеина составляет 8%). При этом из рис. 23в видно, что одновременная добавка 2,5 mM NAC и 4 мкг/мл наночастиц из CuO вызывает утечку флуоресцентного маркера до 23%. Полученные данные подтверждают рост проводимости бислоя из ПОФГ в присутствии NAC, что указывает на взаимодействие NAC с отрицательно заряженными мембранами. Оценка утечки кальцеина, путём измерения интенсивности флюоресценции после добавления компонентов комбинации, подтверждает этот вывод (рисунок 26).

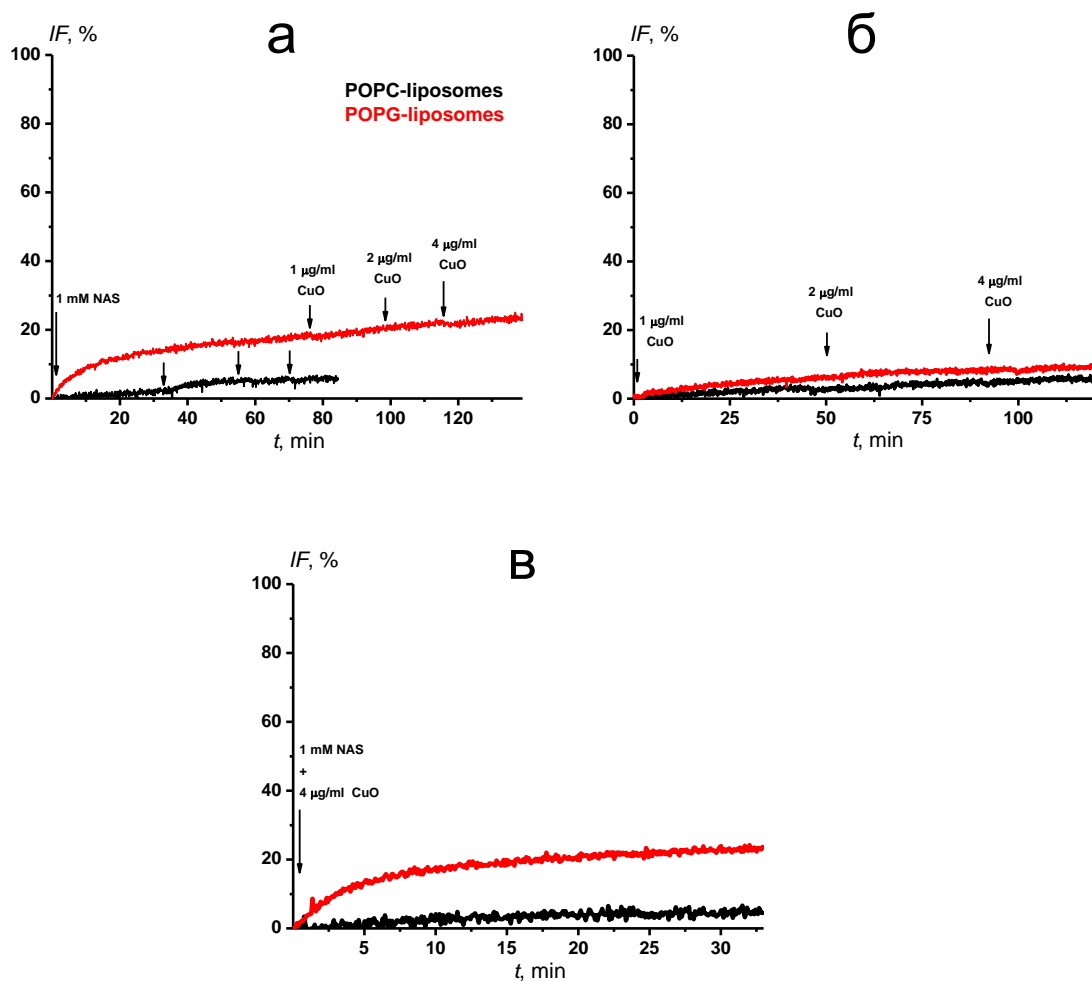
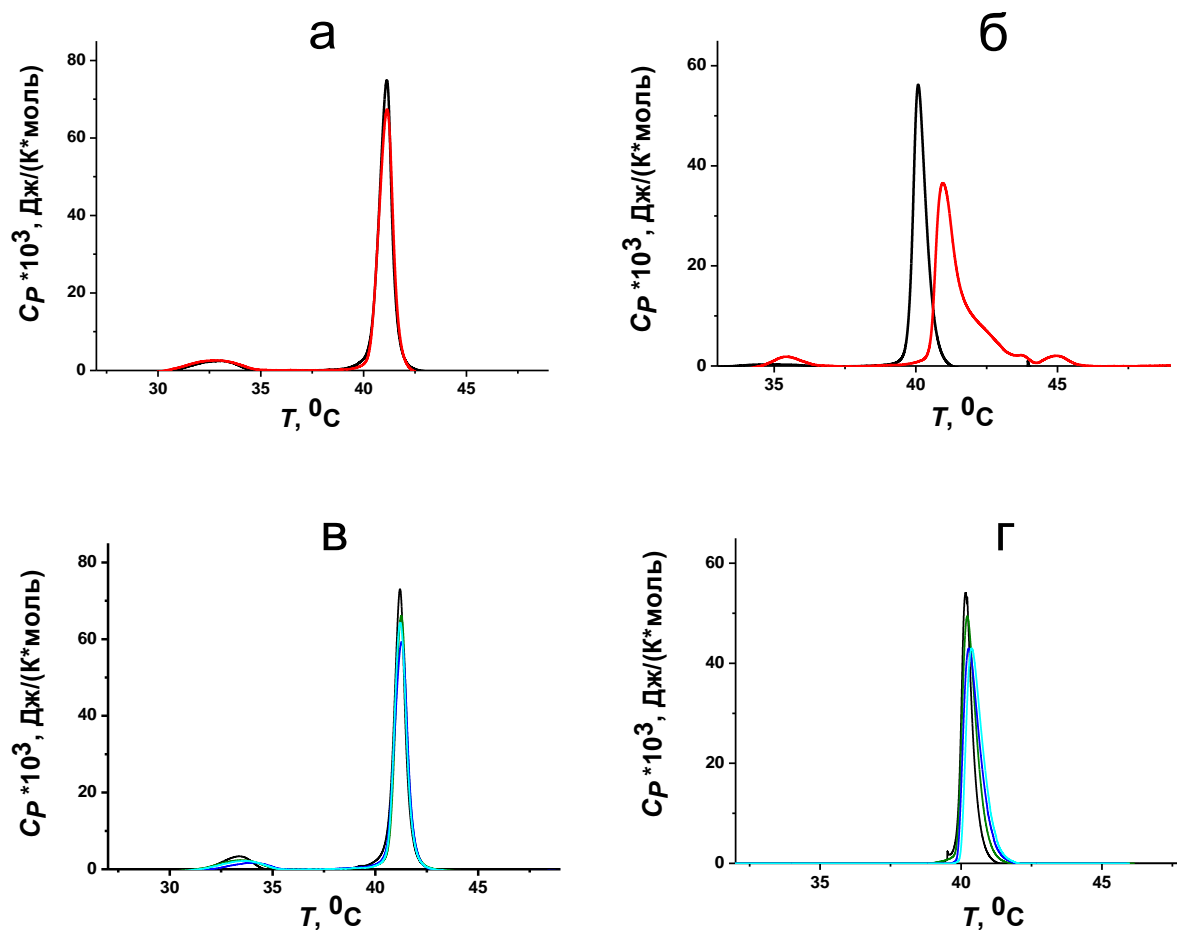


Рисунок 26. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (IF, %) кальцеина, вытекшего из ПОФХ- (черная линия) или ПОФГ- (красная линия) липосом в присутствии отдельно 2,5 мМ NAC (а, первый момент введения), наночастиц из CuO в концентрациях 1, 2 и 4 мкг/мл (б) и комбинации 2,5 мМ NAC и 4 мкг/мл наночастиц из CuO (в) от времени. Момент введения агента указано на рисунке над стрелками.

3.6.2 Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия в присутствии NAC и наночастиц из CuO

На рисунке 27 можно видеть термограммы плавления липосом из ДПФХ и ДПФГ в отсутствие (контроль, *черные линии*) и в присутствии в суспензии липосом 2,5 мМ NAC, наночастиц CuO в концентрациях 1, 2 и 4 мкг/мл и одновременно 2,5 мМ NAC и наночастиц CuO 1 мкг/мл (*зеленая линия*), 2 мкг/мл (*синяя линия*) и 4 мкг/мл (*циановая линия*). В отсутствие каких-либо агентов

температура пред-перехода ДПФХ T_p составляет 32.6°C , температура главного фазового перехода ДПФХ и ДПФГ составляет 41.2°C и 41.1°C , соответственно, ширина основного пика на полувысоте, характеризующая кооперативность фазового перехода, $T_{1/2}$, равна $0.6-0.7^{\circ}\text{C}$. Можно отметить, что тестируемые агенты (отдельно NAC, наночастицы CuO или их комбинация) практически влияют на процесс плавления ДПФХ: во всех случаях пропадает пред-переход и наблюдается незначительный сдвиг пика, соответствующего главному фазовому переходу, вправо на 0.2°C , при этом ширина пика на полувысоте практически не изменяется. Интерпретировать полученный результат ДПФГ в присутствии комбинации NAC и наночастиц CuO затруднительно из-за собственного эффекта NAC. В присутствии NAC уже наблюдается деконволюция основного пика плавления ДПФГ (чего нет в случае ДПФХ), т.е. существует несколько различных по составу и структуре липидных фаз.



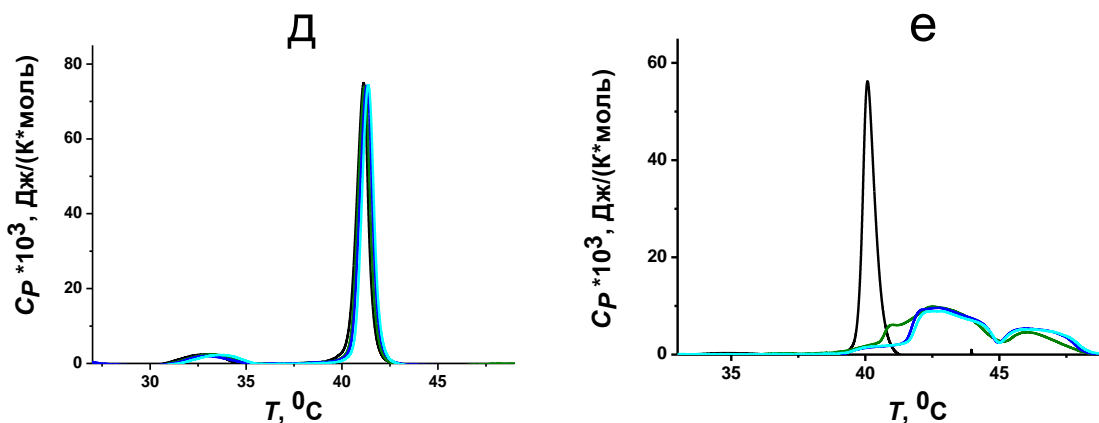


Рисунок 27. Термограммы плавления ДПФХ (а, в, д) и ДПФГ (б, г, е) в отсутствие (контроль, черная линия) и в присутствии 2,5 мМ NAC (а, б), наночастиц CuO в концентрациях 1, 2 и 4 мкг/мл (в, г) и одновременно 2,5 мМ NAC и наночастиц из CuO в концентрациях 1 мкг/мл (зеленая линия), 2 мкг/мл (синяя линия) и 4 мкг/мл (циановая линия) (д, е).

Таблица 5. Термодинамические характеристики ДПФХ/ДПФГ липосом в присутствии агентов

		<i>ДПФХ</i>		<i>ДПФГ</i>	
		$T_m, ^\circ\text{C}$	$T_{1/2}, ^\circ\text{C}$	$T_m, ^\circ\text{C}$	$T_{1/2}, ^\circ\text{C}$
<i>контроль</i>	–	41.2	0.6	41.1	0.7
<i>NAC</i>	1 mM	41.2	0.6	@	@
<i>CuO</i>	1 мкг/мл	41.2	0.6	41.1	0.7
	2 мкг/мл	41.2	0.6	41.1	0.7
	4 мкг/мл	41.2	0.6	41.1	0.7
<i>NAC + CuO</i>	1 mM + 1 мкг/мл	41.2	0.6	@	@
	1 mM + 2 мкг/мл	41.3	0.6	@	@
	1 mM + 4 мкг/мл	41.3	0.6	@	@

T_m – температура основного фазового перехода

$T_{1/2}$ – ширина пика на полувысоте, характеризующая кооперативность фазового перехода

@ – наблюдается деконволюция основного пика плавления ДПФГ

3.7 Взаимодействие медьорганических комплексов с НАС

Так как наночастицы не всегда являются удобным инструментом терапевтического воздействия, а также обладают рядом фармакологических недостатков, нами было решено провести эксперименты с малыми органическими комплексами [147]. Кроме того, это позволило бы определить возможность участия меди, заключенной в органический каркас, в описанных реакциях. Также интерес представляла и активность свободных ионов меди, а потому в экспериментальную модель был введён ацетат меди, растворимая соль данного металла.

Как видно из рисунка 28, полученные результаты очень близки к тем, что были получены для наночастиц. Добавление N-ацетилцистеина также усиливает цитотоксичность медьорганических комплексов (формулы соединений приведены в таблице 2), в особенности комплексов двухвалентной меди. Цитотоксичность ацетата меди также увеличивалась. Следует ещё раз отметить, что N-ацетилцистеин в данном эксперименте сам по себе не снижал выживаемости клеток.

Примечательно, что цитотоксичность органических комплексов без металла в составе не усиливается добавлением N-ацетилцистеина. Эти результаты говорят о том, что именно наличие меди является необходимым условием протекания реакции с восстановителем.

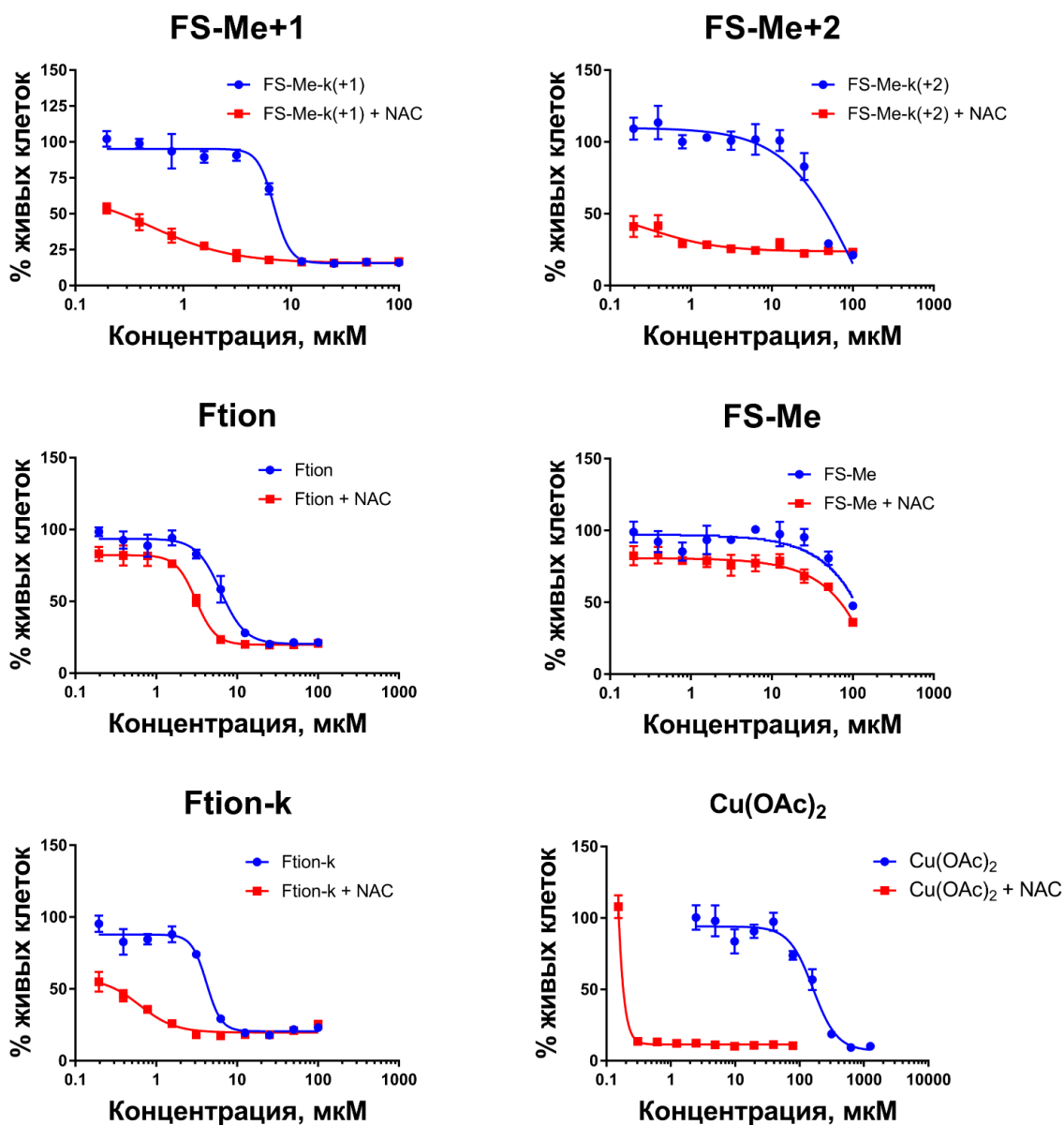


Рисунок 28. МТТ-тест с различными медьсодержащими органическими комплексами и ацетатом меди в комбинации с N ацетилцистеином (2,5 мМ) на культуре клеток K562.

Кроме комплексов, указанных выше, были также протестированы и другие, в которых медь находится в ином органическом окружении. Целью таких экспериментов было определить способна ли медь принимать участие в реакции находясь в составе различных органических структур. На рисунках 29, 30 и 31 отражены эксперименты с комплексами, формулы которых представлены на рисунке 32.

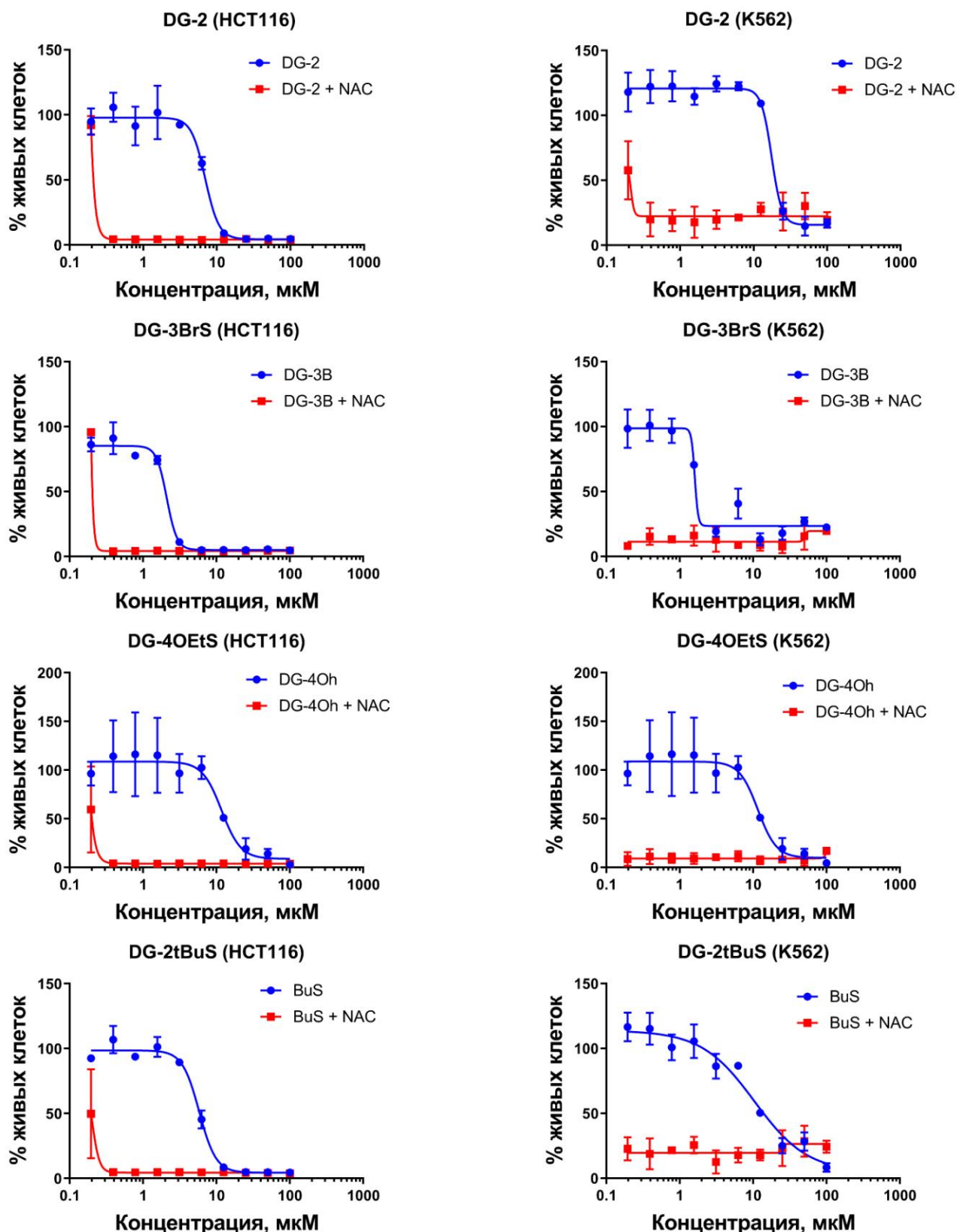


Рисунок 29. Эксперименты по определению цитотоксического эффекта комбинации различных медьсодержащих комплексов и NAC (2,5 мМ). DG-2 – медьорганический комплекс FS-Me+2.

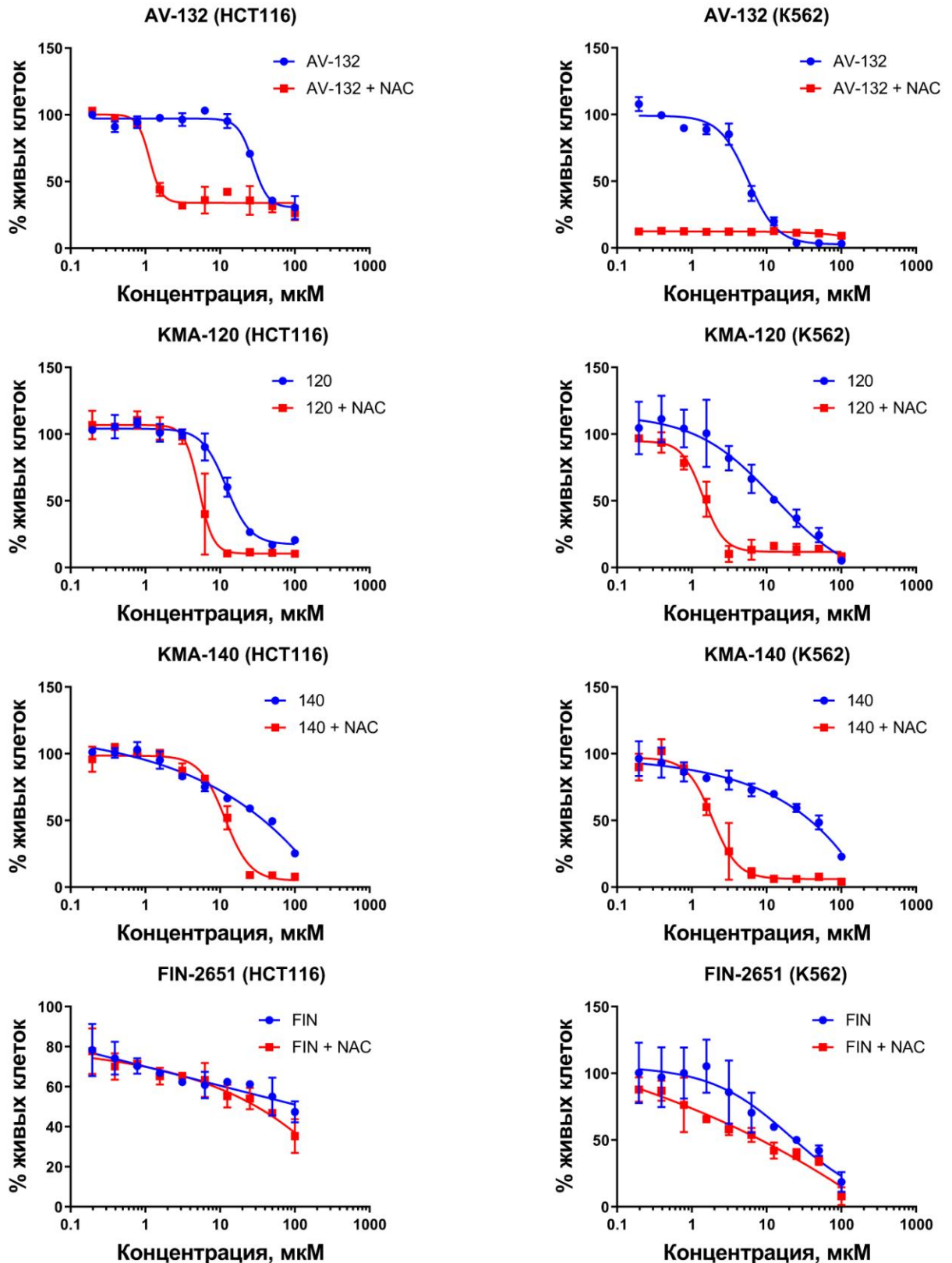


Рисунок 30. Эксперименты по определению цитотоксического эффекта комбинации различных медьсодержащих комплексов и NAC (2,5 мМ).

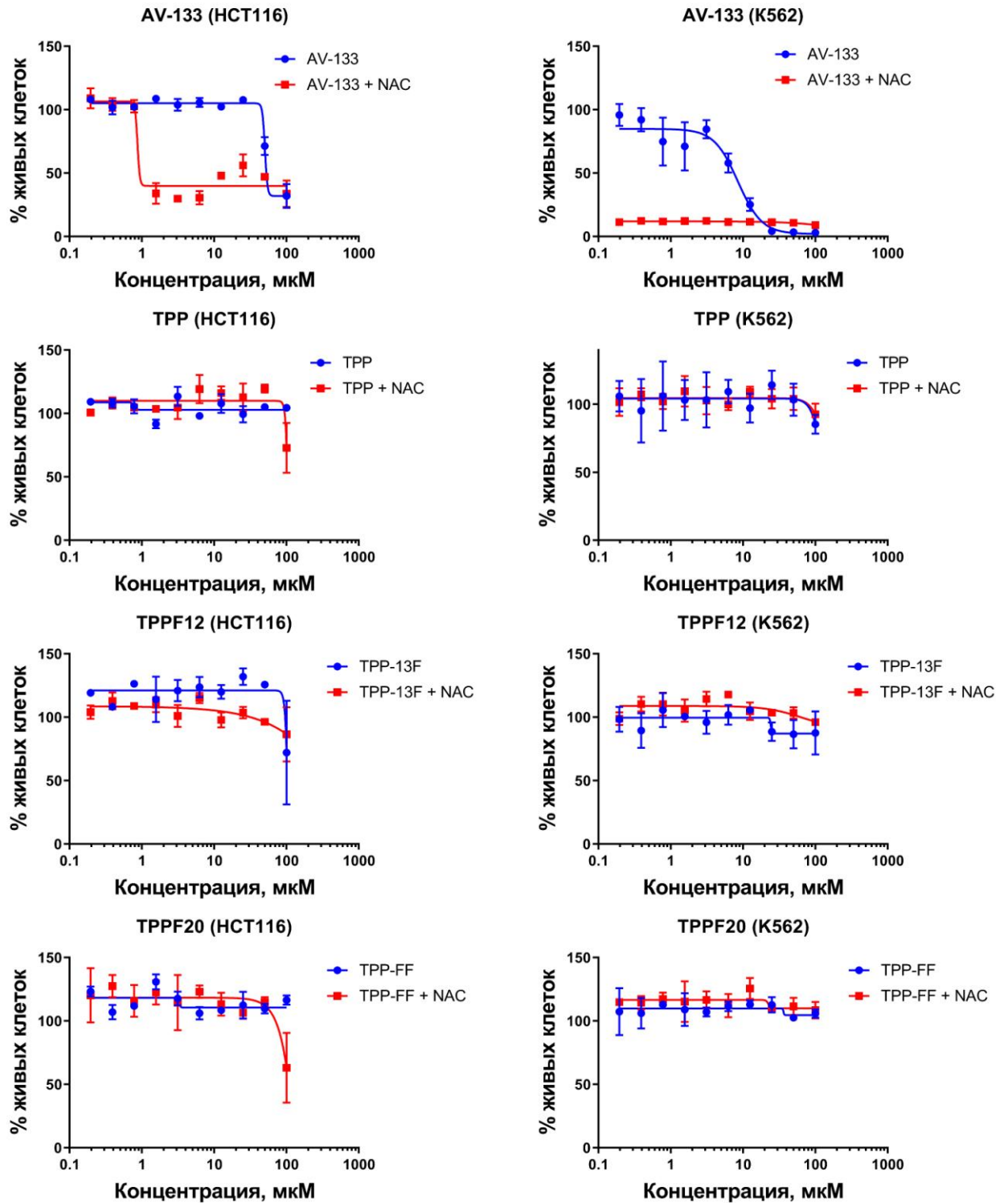


Рисунок 31. Эксперименты по определению цитотоксического эффекта комбинации различных медьсодержащих комплексов и NAC (2,5 мМ).

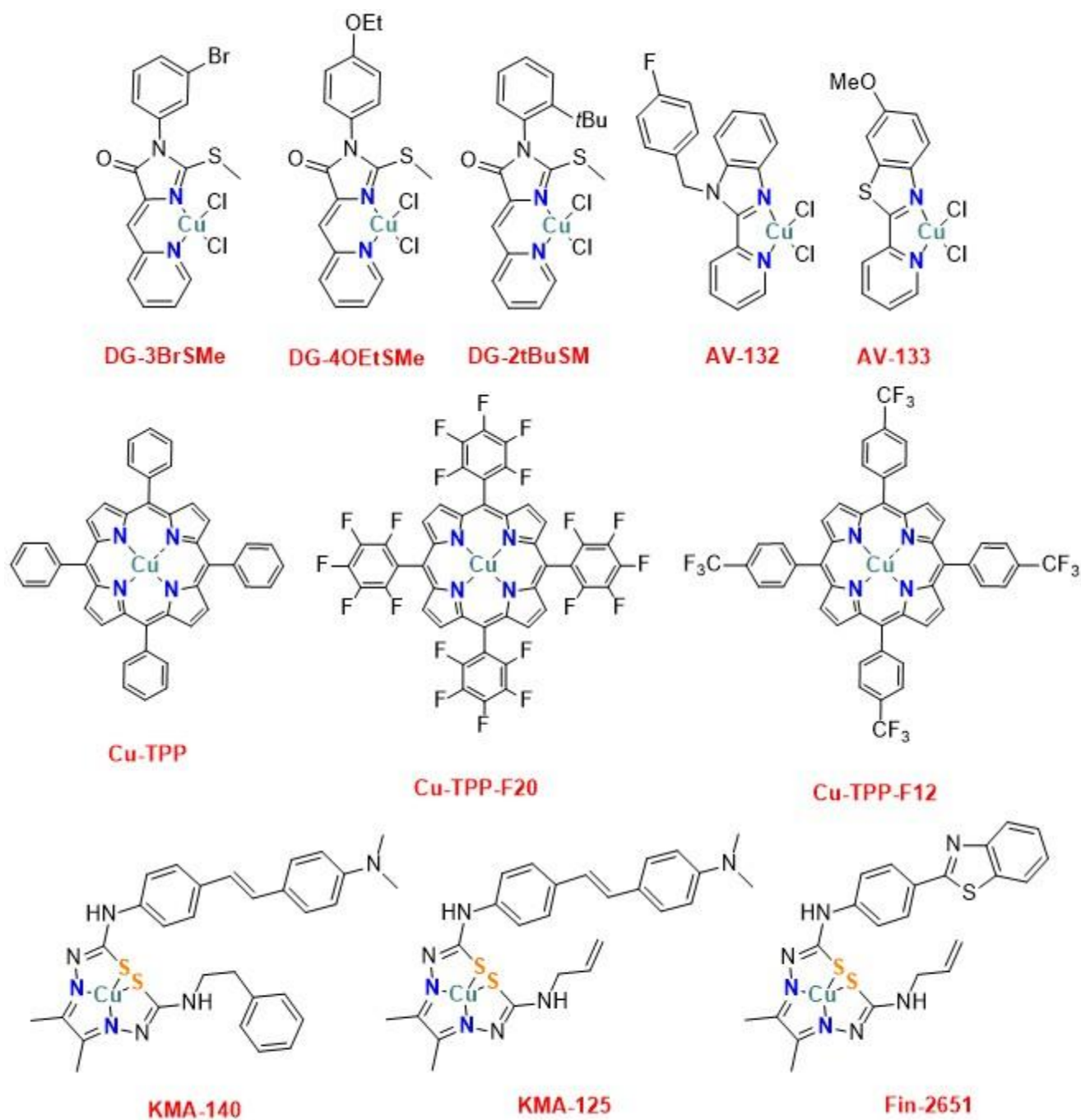


Рисунок 32. Формулы дополнительно протестированных соединений.

Кроме того, нами также были проведены эксперименты по одновременному добавлению компонентов комбинации к клеткам. Это было сделано с целью выяснить: 1) возможно ли будет применять медьорганический комплекс отдельно, позволяя ему какое-то время действовать и аккумулироваться внутри опухоли, после чего применять второй компонент; 2) будет ли комплекс метаболизирован в клетке так, что больше не сможет реагировать с NAC, а значит цитотоксический эффект также исчезнет. Данные такого эксперимента

представлены на рисунке 33. Цитотоксичность комбинации постепенно снижалась при увеличении времени инкубации клеток с комплексом, однако, эффект взаимодействия всё же сохранялся, что говорит о том, что компоненты комбинации можно вводить по очереди. Это увеличивает количество возможных путей клинического применения данных соединений.

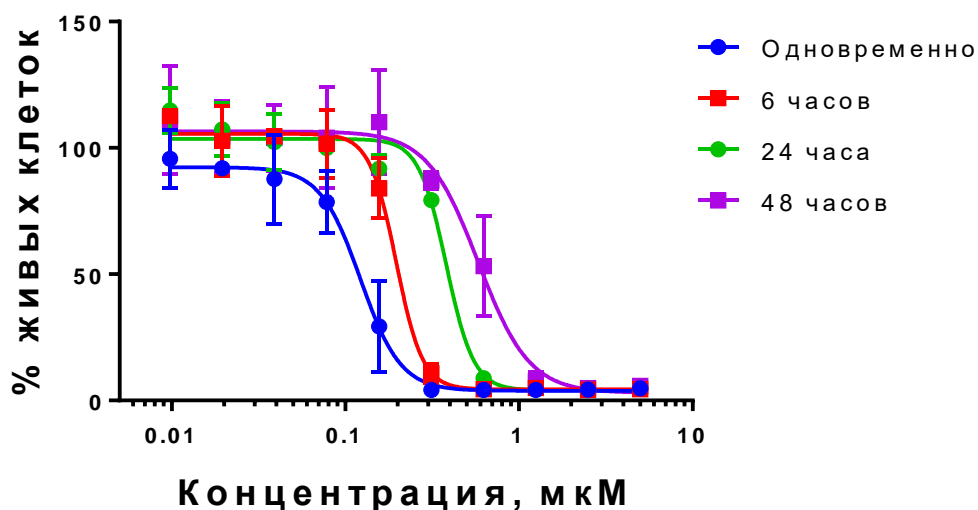


Рисунок 33. Влияние времени инкубации препарата FS-Me(+2) на его дальнейшую эффективность в контексте взаимодействия с NAC. Клеточная культура – НСТ116.

3.8 Выявление химической природы взаимодействия между медьсодержащими соединениями и N-ацетилцистеином

Так как обнаруженный эффект усиления цитотоксичности медьсодержащих соединений при добавлении N-ацетилцистеина оказался нетривиальным, нами также были предприняты попытки объяснить механизм формирования АФК и взаимодействия между компонентами. В литературе описан схожий эффект [110], однако, авторы отметили апоптотический характер гибели, а также высказали предположение, что N-ацетилцистеин действует как «генератор АФК». Тем не менее авторы не приводят четких указаний на то, какой именно механизм взаимодействия у этих веществ.

Так как генерация АФК может ускоряться переходными металлами за счёт участия в реакции Габера-Вейса, нами было высказано предположение, что

N-ацетилцистеин способствует восстановлению двухвалентной меди, которая затем передает электрон дальше, создавая новые реактивные радикалы. Для проверки этого предположения мы воспользовались несколькими методами. Первым был тест Элмана, который направлен на выявление свободных тиольных групп. Результаты представлены на рисунке 34.

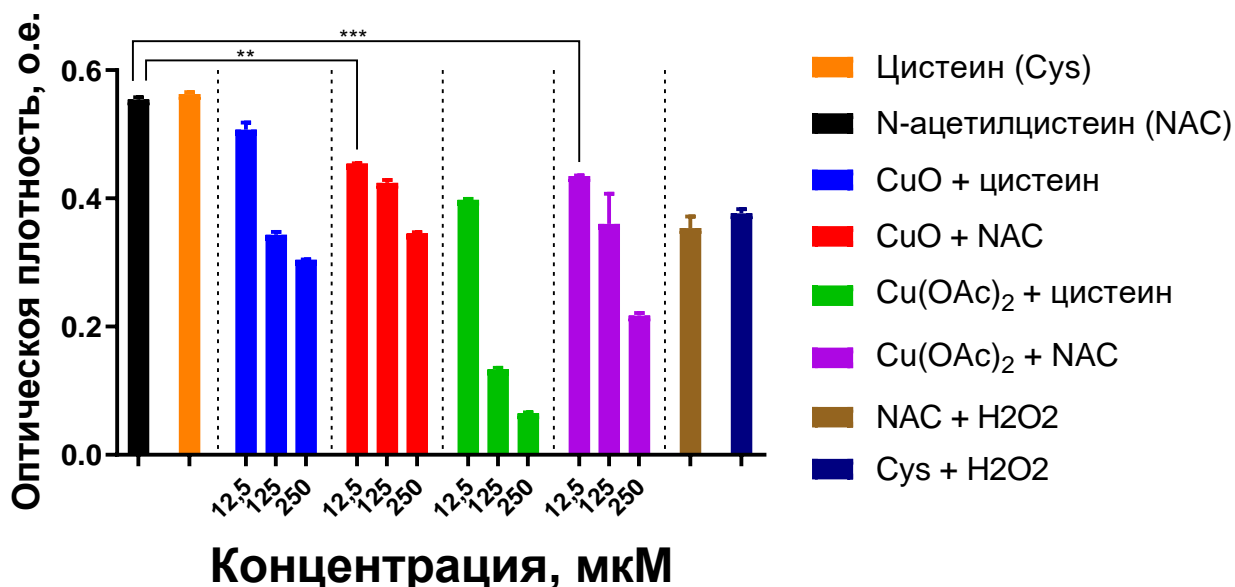


Рисунок 34. Тест Элмана для различных медь- и тиолсодержащих соединений. Различия между выборками определялись, используя критерий Манна-Уитни. ** – уровень значимости меньше 0,01 ($p < 0,01$), *** – $p < 0,001$.

Заметно, что добавление медьсодержащих соединений к растворённым NAC и цистеину действительно снижает концентрацию свободных тиольных групп, причем дозозависимым образом. Наибольшую способность к окислению тиольных групп проявляет ацетат меди, по-видимому ввиду его большей растворимости в воде. Стоит отметить, что перекись водорода также снижает число свободных тиольных групп, что говорит о том, что происходит именно их окисление. Это подтверждает роль меди как окислителя: получая электрон от тиольной группы металл далее участвует в реакциях Габера-Вейса и Фентона, что приводит к генерации АФК.

Несмотря на уменьшение количества тиольных групп в тесте Элмана, это ещё не является убедительным доказательством того, что идёт именно

восстановление меди. Для прямого измерения данного процесса был применен метод циклической вольт-амперометрии (ЦВА) и вращающегося дискового электрода (ВДЭ). Чтобы проверить гипотезу о восстановлении Cu^{2+} мы изучили реакции восстановителей NAC или аскорбата с НЧ CuO , а также с медьорганическим комплексом FS-Me+2 (рисунок 35), который содержал один ион меди в степени окисления Cu^{+2} . Вольтамперограмма ВДЭ позволяет идентифицировать окислительно-восстановительные переходные состояния металлов. Для соединений одновалентной меди наблюдался только ток окисления (анодный процесс $\text{Cu}^{+1} \rightarrow \text{Cu}^{+2}$) тогда как для соединений, содержащих двухвалентную медь, наблюдался ток восстановления (катодная реакция $\text{Cu}^{+2} \rightarrow \text{Cu}^{+1}$). Для смесей, содержащих $\text{Cu}^{+1}/\text{Cu}^{+2}$, вольтамперограммы показали как анодный, так и катодный токи. Вольтамперограммы регистрировали при 960-250 мВ, что соответствует переходу Cu^{+2} в Cu^{+1} в соединении FS-Me.

В экспериментах ВДЭ в рамках данного диапазона электрического потенциала раствор медьорганического комплекса (Cu^{2+}) выявил только катодную волну (отрицательные значения тока), соответствующую электрохимическому восстановлению $\text{LCu}^{2+} \rightarrow \text{LCu}^{1+}$. При добавлении NAC или аскорбата (молярное соотношение 1:1), катодный ток уменьшился, а анодный ток увеличился на вольтамперограмме, записанной через 5 мин, что указывает на химическое восстановление Cu^{2+} до Cu^{1+} с помощью NAC или аскорбата. Значение катодного тока отражает долю невосстановленного (исходного) комплекса LCu^{+2} в растворе, тогда как значение анодного тока отражает долю восстановленного LCu^{+1} в конкретное время.

В реакции FS-Me+2 с NAC в соотношении 1:1 равновесие устанавливалось через 25 мин при отношении анодного тока к катодному 5:1. При трехкратном превышении NAC волна с полностью положительными значениями тока наблюдалась через 5 мин, что соответствует процессу окисления, образующегося в растворе комплекса с одновалентной медью $\text{LCu}^{+1} \rightarrow \text{LCu}^{+2}$, где L представляет собой органический лиганд. При взаимодействии FS-Me+2 с аскорбатом в

соотношении 1:1 восстановление Cu^{+2} до Cu^{+1} в комплексе протекало медленнее; равновесие анодного тока и катодного тока 3:1 установилось через 100 мин. При соотношении аскорбат/комплекс 3:1 полное восстановление LCu^{+2} завершается в течение 40 мин. При восстановлении Cu^{+2} до Cu^{+1} окисление НАС является одноэлектронным процессом, в то время как окисление аскорбата – двухэлектронный процесс; тем не менее, восстановление Cu^{+2} аскорбатом протекали медленнее, чем восстановление НАС. По-видимому, разная скорость реакции в присутствии НАС или аскорбата указывают на разные механизмы окисления самих восстанавливающих молекул. Таким образом, НАС и аскорбат в трехкратном избытке полностью восстанавливали Cu^{+2} до Cu^{+1} в растворе с медьорганическим комплексом в течение короткого времени. Восстановление Cu^{+2} до Cu^{+1} в присутствии НАС наблюдали с помощью ВДЭ. Для суспензии НЧ CuO этот процесс изучался в смеси диметилформамид/вода. Однако в этой гетерогенной системе эффект был менее заметен из-за малой интенсивности анодного и катодного токов.

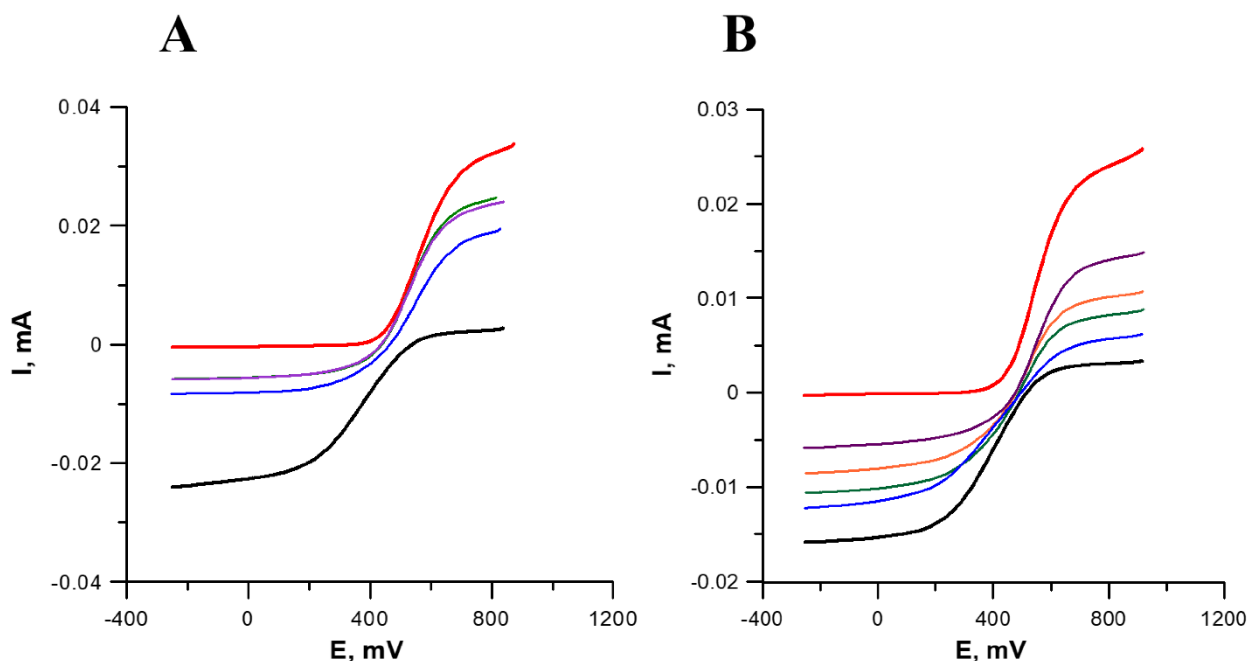


Рисунок 35. Вольтамперограммы (ВДЭ) восстановления Cu^{+2} в соединении 1. А, смесь соединения 1 и НАС в соотношении 1:1 регистрировалась последовательно в течение 25 мин после смешивания реагентов (синяя, фиолетовая и зеленая кривые); зарегистрирован через 5 мин после смешивания FS-ME и НАС в

соотношении 1:3 (красный). Б, смесь FS-Me и аскорбата в соотношении 1:1, зарегистрированная последовательно в течение 100 мин после смешивания реагентов (синий, оранжевый, зеленый и фиолетовый); зарегистрирована через 40 минут после FS-ME+2 и аскорбата в соотношении 1:3 (красный). Черный, только FS-Me+2.

3.9 Исследование противоопухолевой активности комбинации *in vivo*

Накопленные данные относительно механизма клеточной гибели, а также химической природы реакции позволили начать проверку противоопухолевой эффективности комбинации *in vivo*. Первым шагом стало определение максимальных переносимых доз для компонентов комбинации. Из-за её контактного действия, приводящего к нарушению проницаемости плазматической мембраны, было решено сосредоточиться на локальном применении, а именно попытаться привести к гибели опухолевые клетки, развивающиеся в брюшной полости. Это позволило бы локализовать цитотоксический эффект комбинации, направив его в основном именно на опухоль.

Испытание комбинации решено было провести на самках мышей линии Balb/c. Средний вес животных в первом эксперименте составлял 25 г, возраст – 3 месяца. В таблице 5 и 6 приводятся данные такого эксперимента с НЧ CuO, NAC и их комбинацией. Вначале были подобраны дозы для наночастиц и NAC, после чего выявленные нетоксичные дозы использовались для одновременного введения для проявления эффекта комбинации.

Таблица 5. Исследование токсического действия НЧ CuO и NAC

Доза, мг/кг (мг/мышь)	Результат
400 (8)	Умерли в первые часы
200 (4)	
100 (2)	
50 (1)	Умерли в течение 24 ч
25 (0,5)	
12 (0,25)	
6 (0,13)	Живы после однократного введения
3 (0,06)	
1,5 (0,03)	

В таблице 6 приводятся результаты проведённой работы по введению комбинации веществ мышам линии Balb/c. Кроме однократных введений были также опробованы ежедневные режимы введения, так как предполагается, что действие комбинации будет реализовываться краткосрочно, и могут понадобиться дополнительные многократные введения для полной элиминации популяции опухолевых клеток и предотвращения рецидивов.

Таблица 6. Эксперименты на лабораторных мышах линии Balb/c с комбинацией НЧ CuO и NAC

Доза, мг/кг (мг/мышь)	Количество введений	Результат
6 (0,125)	1	Живы
	2	Живы
	4	Умерла через 24 ч после 4-го введения
3 (0,0625)	1	Живы
	2	Живы
	4	Живы
1,5 (0,03125)	1	Живы
	2	Живы
	3	Умерла через 24 ч после 3-го введения

Такой же формат проведения эксперимента позволил установить максимально эффективные и в то же время нетоксичные дозы для двухвалентного комплекса меди (FS-Me(+2)), а также острую токсичность для комбинации FS-Me + NAC (рисунок 36).

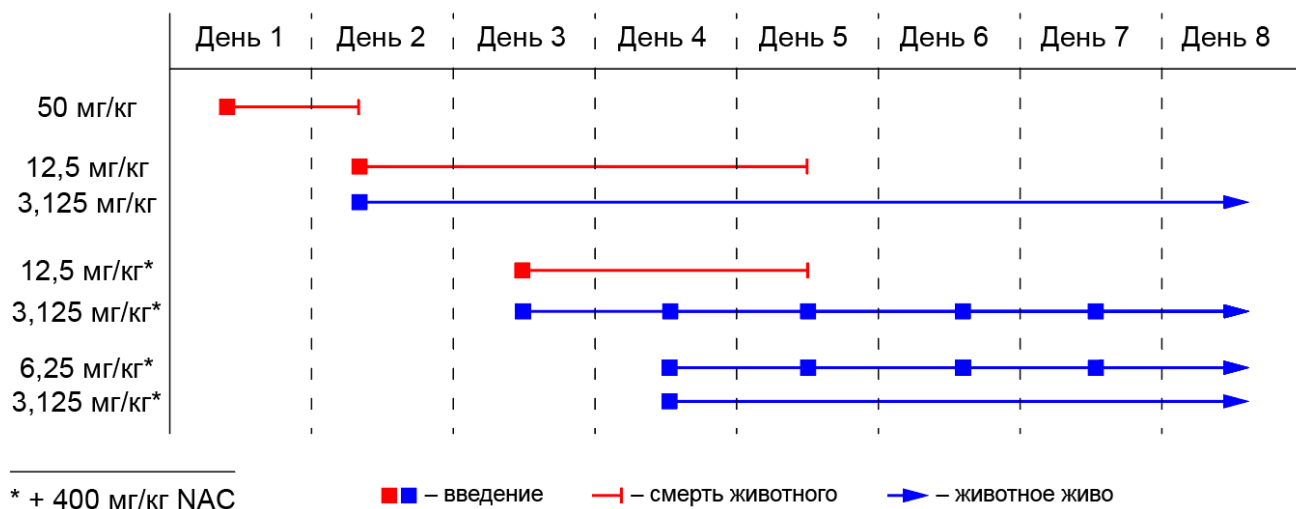


Рисунок 36. Определение острой токсичности органического комплекса меди на мышах линии Balb/c.

Таким образом, результаты двух экспериментов говорят о том, что выявленные максимальные переносимые дозы следующие: для НЧ CuO – 3 мг/кг, для $\text{FS-Me}+2$ – 6,125 мг/кг, для NAC – до 800 мг/кг.

Следующим шагом стало испытание противоопухолевых свойств комбинации. Для этой цели мышам линии Balb/c перевивалась опухоль Эрлиха, которая развивается в асците. Стоит отметить, что в этом эксперименте было решено протестировать эффективность комбинации именно медьорганического комплекса и NAC, так как органический комплекс рассматривается как более перспективное терапевтическое средство из-за возможности создания различных модификаций с разной активностью. День перевивки считался нулевым днем, комбинация медьорганического комплекса и NAC, а также компоненты по отдельности вводились на второй день эксперимента.

Кривые Каплана-Мейера, позволяющие судить об увеличении срока продолжительности жизни отображены на рисунке 37. Значимого эффекта добиться не удалось: выживаемость животных осталась на прежнем уровне, однако, судя по результатам измерения массы тела удалось замедлить скорость роста опухоли (рисунок 38).

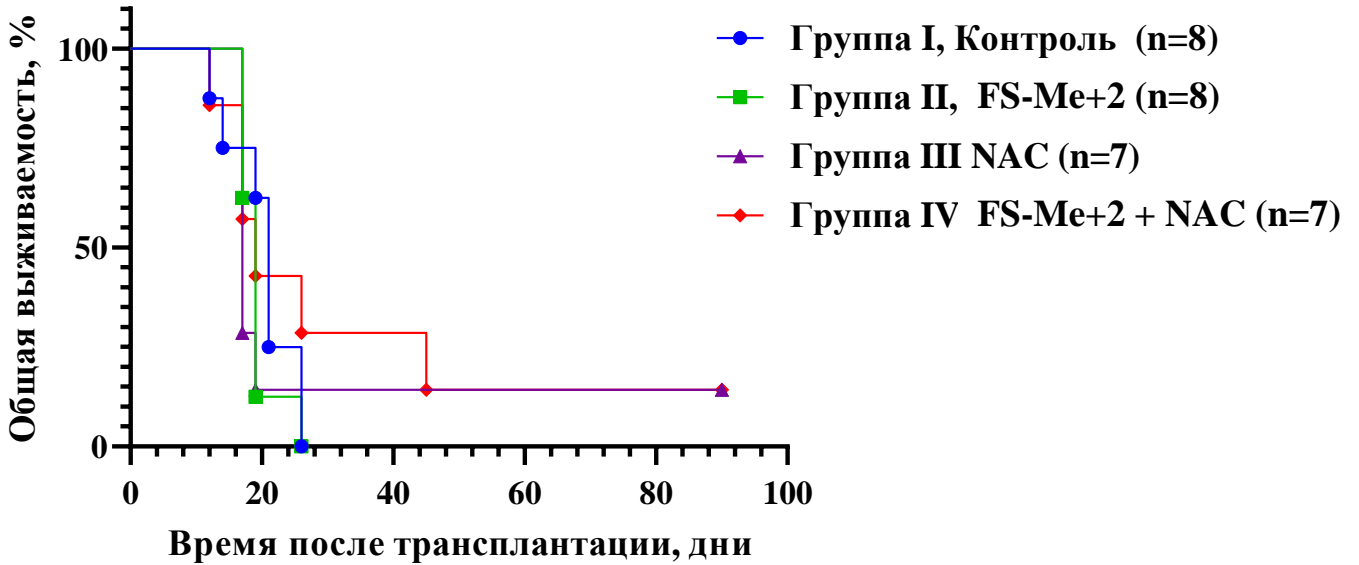


Рисунок 37. Динамика выживаемости мышей BALB/c с трансплантированной карциномой Эрлиха после введения соединений FS-Me+2, NAC и комбинации FS-Me+2 + NAC.

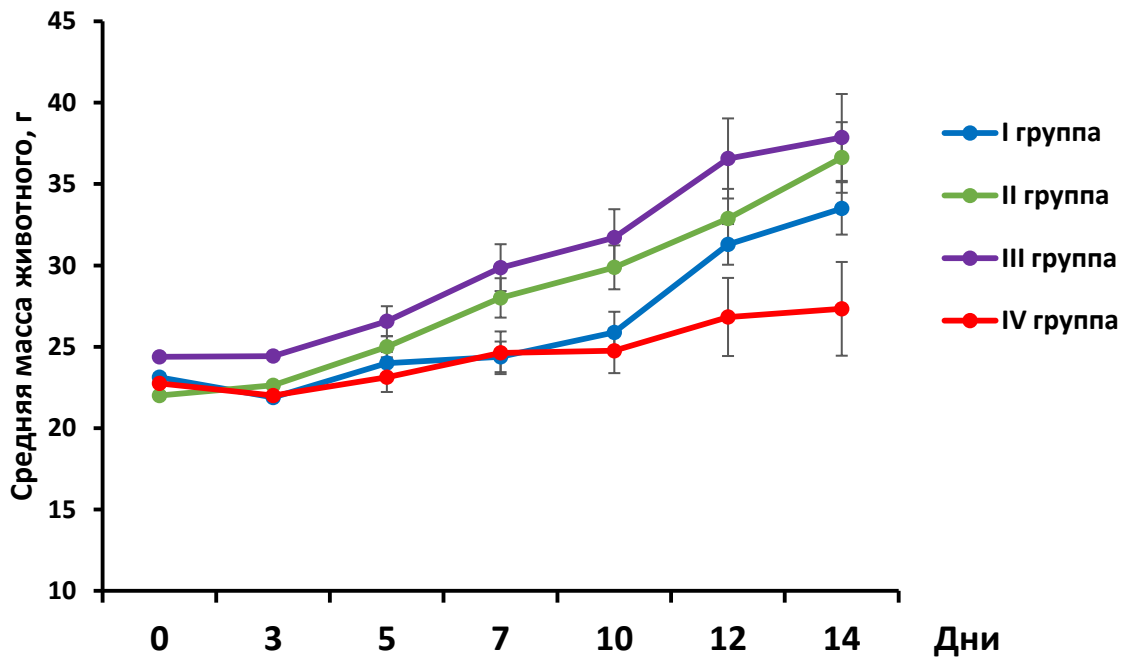


Рисунок 38. Динамика изменения массы мышей BALB/c с трансплантированной карциномой Эрлиха после введения соединений FS-Me+2, NAC и комбинации FS-Me+2 + NAC.

Для доказательства гибели клеток в асците дополнительно взяты животные с привитой опухолью, которым комбинация вводилась на 10-й день эксперимента, после чего клетки забирали из брюшной полости для анализа выживаемости на проточном цитофлуориметре. Из рисунка 39 видно, что, во-первых, клеточная гибель хоть и выше, чем в контрольных животных без комбинации, однако, составляет лишь 25% всей популяции. Во-вторых, процент погибших клеток у мышей, получавших комбинацию, через 24 часа такой же, как и у контрольных животных.

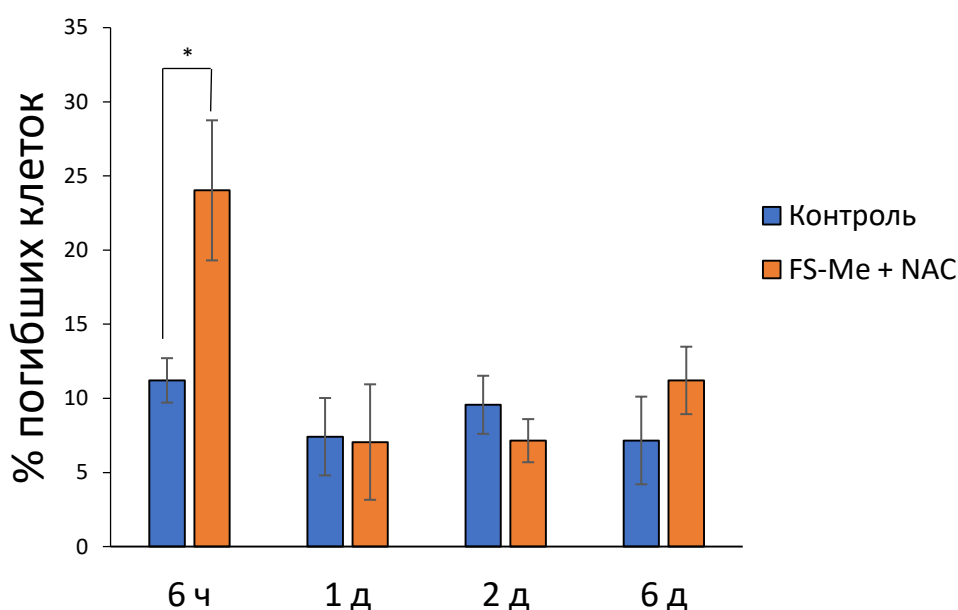


Рисунок 39. Гистограмма клеточной гибели клеток опухоли Эрлиха растущей в асците после добавления комбинации FS-Me+2 и NAC на 10-е сутки после прививки опухоли. Различия между выборками определялись, используя критерий Манна-Уитни. ** – уровень значимости меньше 0,01 ($p < 0,01$), *** – $p < 0,001$.

Низкий процент быстрой клеточной гибели может быть связан со сгущением клеток, так как в асците их количество значительно больше, нежели нами использовано в экспериментах на культурах клеток. Исходя из этих данных, мы решили провести эксперименты по сгущению клеток и определить их выживаемость после добавления комбинации. Из рисунка 40 видно, что более высокая плотность клеток способствует выживаемости.

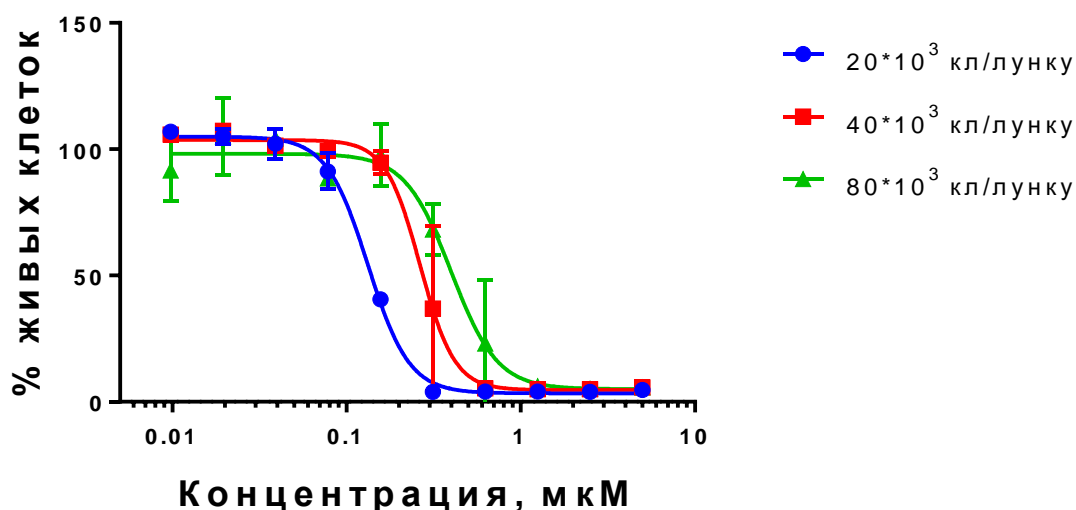
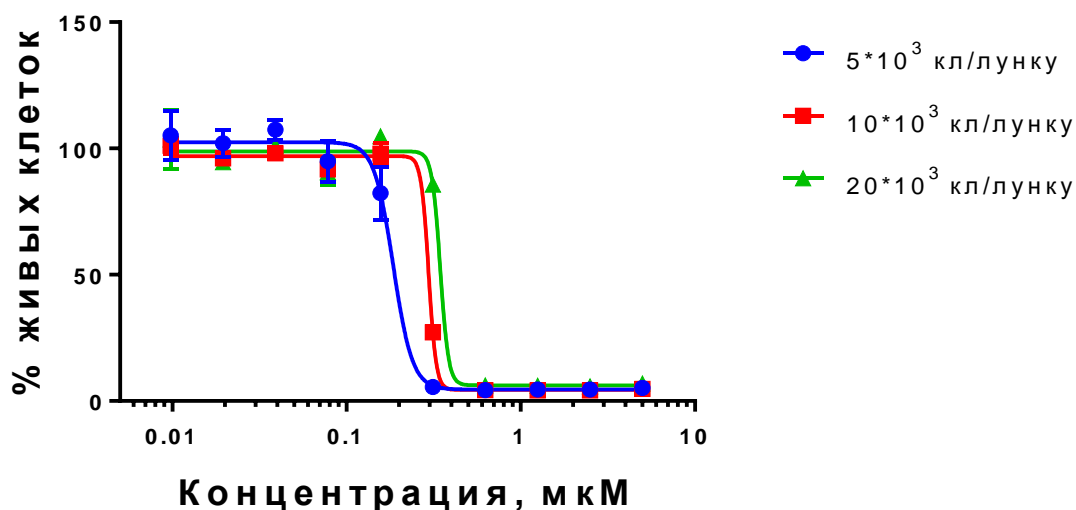


Рисунок 40. Влияние плотности клеточной культуры на противоопухолевую активность комбинации FS-Me(+2) + NAC. В качестве модели использованы клетки, выделенные из асцита мышей с привитой опухолью Эрлиха.

Таким образом, комбинация медьорганического комплекса и NAC теряет эффективность при повышении плотности (сгущении) опухолевых клеток. Возможными способами обойти это ограничение являются повышение применяемой концентрации действующих веществ, а также их многократное введение, что будет способствовать устранению популяции опухолевых клеток по частям.

Второй эксперимент на опухолевой модели был проведён для сравнения эффективности комбинации с конвенциональным химиопрепаратом цисплатином.

Цисплатин был выбран в качестве вещества сравнения, так как довольно широко распространён в клинической практике, а также является металлсодержащим препаратом, что соответствует нашему соединению. Продолжительность жизни животных вновь не возросла при применении комбинации, однако, динамика смертности схожа с таковой в группе, которой вводили цисплатин (рисунок 41).

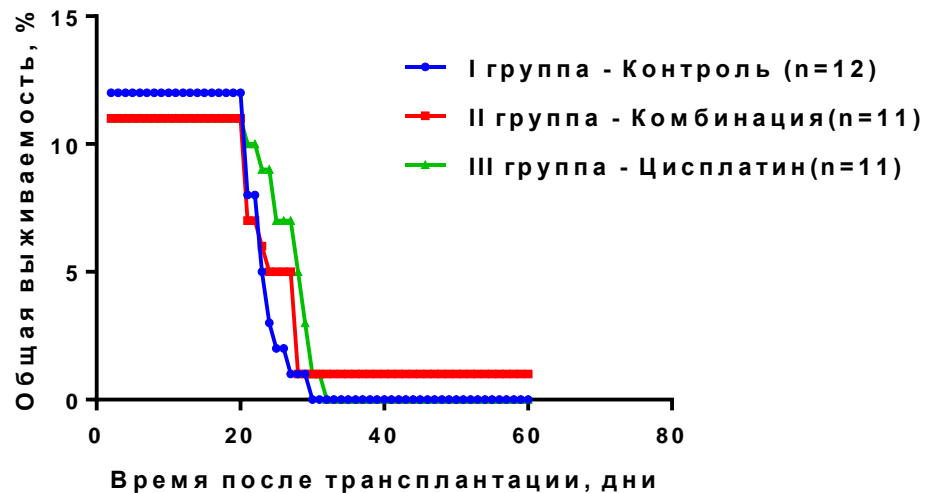


Рисунок 41. Кривые Каплана-Майера для мышей Valb/c с привитой опухолью Эрлиха. Каждая группа состояла из 11 животных. Первая группа – контроль (животные с опухолью и без препаратов), вторая – животные, которым вводилась комбинация, третья – цисплатин.

Кроме того, торможение роста опухоли для группы, получавшей комбинацию было таким же, как и для группы, которой вводился цисплатин (рисунок 42), что говорит, о сравнимой противоопухолевой эффективности комбинации соединений меди и NAC с конвенциональной химиотерапией.

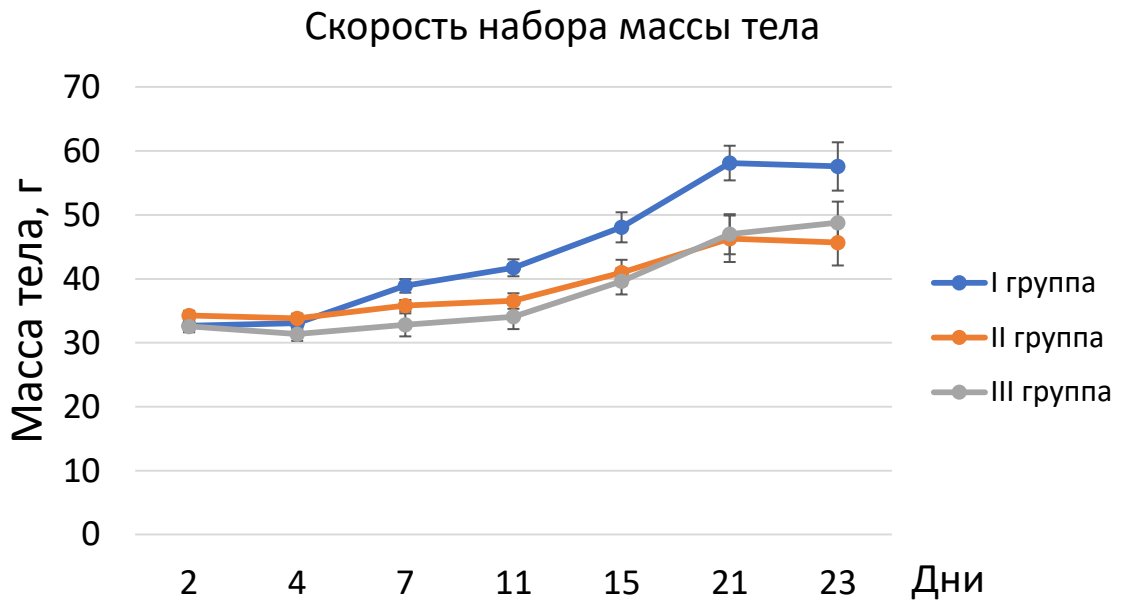


Рисунок 42. Скорость набора массы тела мышей Balb/c, отражающая скорость роста опухоли. Группа I – контроль, группа II – животные, получавшие комбинацию, группа III – животные, получавшие цисплатин.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящий момент в области химиотерапии опухолевых заболеваний всё ещё продолжается поиск эффективных средств лечения. На этом пути обнаружения эффективной терапевтической стратегии возникает множество препятствий, и одним из самых серьезных является формирование лекарственной устойчивости [1, 3, 5]. Несмотря на нынешний прогресс и появление большого многообразия препаратов, всё ещё остаются пути, благодаря которым раковые клетки могут различными способами избежать гибели и выжить, вызывая рецидив заболевания. Резистентные клетки гораздо сложнее поддаются лечению, а клинические рекомендации в таких случаях оказываются неэффективны, либо отсутствуют вовсе. В случае терминальной опухоли зачастую не только невозможно подобрать адекватную химиотерапию, но и самого времени для такого подбора чрезвычайно мало. Учитывая, что механизмы апоптоза оказываются заблокированы, преодолеть лекарственную устойчивость возможно лишь применением стимула с многокомпонентным действием, который запустит иные формы клеточной гибели [2, 5]. Благодаря своей высокой реакционной способности АФК способны взаимодействовать с белками, ДНК и липидами, нарушая их структуру или изменяя функцию. Так как в опухолевой клетке нарушен окислительно-восстановительный баланс, именно этот эффект может быть полезен для элиминации злокачественных новообразований, устойчивых к стандартным химиотерапевтическим соединениям и стратегиям лечения [77]. Основной задачей оксидативной терапии является создание методов направленного воздействия на редокс-баланс клетки, и, как было выявлено, наночастицы в этом контексте сулят определённые перспективы [148].

В этой работе детально анализируется эффект усиления цитотоксической активности различных медьсодержащих соединений за счёт добавления N-ацетилцистеина и других тиолсодержащих соединений и восстановителей. Результаты, полученные в ходе исследования, позволяют с уверенностью сделать вывод о значительном усилении цитотоксичности наночастиц, солей и

органических комплексов меди при добавлении соответствующих концентраций НАС. Данный эффект реализуется за счёт генерации АФК и повреждения мембраны, что особенно полезно при борьбе с резистентными клетками. Данное воздействие обладает значительным потенциалом для дальнейшего создания на его основе новых стратегий для борьбы с терминальными опухолями.

На начальных этапах удалось выяснить, что значения IC_{50} для соединений меди в комбинации в несколько сотен раз ниже, чем для них же без НАС. Так, если IC_{50} наночастиц оксида меди для клеточной культуры K562 составляло 9 мкг/мл, то после добавления НАС (2,5 мМ) это значение снизилось до 10 нг/мл, то есть цитотоксичность увеличилась почти в 1000 раз. Этот эффект был показан для всех протестированных клеточных линий, однако, степень усиления может варьировать от 40 до 700 раз, чего не было показано в предыдущих работах [110, 147]. Установление взаимосвязи между фенотипом клеточной популяции и степенью усиления цитотоксичности представляется важной задачей для будущих исследований. Одно из основных наблюдений заключается в том, что усиленная цитотоксичность комбинации сохраняется даже в условиях формирования лекарственной устойчивости. Таким образом, одна из задач данной работы по доказательству эффективности комбинации медьсодержащих веществ и N-ацетилцистеина в отношении резистентных опухолевых клеток была выполнена.

Было также показано, что восстановлению антиоксидантами с дальнейшей генерацией АФК подвержена именно медь, что можно считать её уникальной особенностью. Железо, цинк, кобальт и молибден не проявили схожих свойств в наших экспериментах. Похожие результаты были получены исследователями и ранее [110]. Во многих работах описывается скорее протекторное действие антиоксидантов при интоксикации металлами [149, 150, 151]. В то же время следует расширить и тщательно проверить спектр металлов, способных участвовать в тех же взаимодействиях, что и медь. Например, наночастицы или соли никеля [152], а также итрия [153] могут представлять особый интерес в данном контексте. Важность наличия меди для взаимодействия с

антиоксидантами подтверждается и экспериментами с медьорганическими комплексами: цитотоксичность органического остова без металла не усиливается в присутствии восстановителя. Следует также обратить внимание на то, что введение меди и добавление NAC усиливает цитотоксичность не всех органических комплексов. Порфириновые медьорганические соединения не взаимодействовали с антиоксидантом и их цитотоксичность не увеличивалась в его присутствии. Скорее всего это связано с растворимостью данных соединений либо же с принципиальной невозможностью взаимодействия атома меди в составе таких комплексов с NAC.

Среди соединений, способных усиливать цитотоксичность меди находятся все тиолсодержащие вещества, такие как глутатион и цистеин. Стоит отметить, что окисленный глутатион и метионин, в которых атом серы связан с другим атомом серы или углеродом, соответственно, не способны участвовать в данной реакции. Это говорит о том, что сера должна быть доступна для взаимодействия, то есть быть способной к восстановлению меди. Другие антиоксиданты, в которых отсутствует тиольная группа, по-разному взаимодействуют с медьсодержащими соединениями. Так, например, аскорбиновая кислота (витамин С) также значительно усилила цитотоксичность наночастиц CuO, в то время как токоферол (витамин Е) не приводил к такому эффекту, что согласуется с данными предыдущих работ [149]. В то же время имеются некоторые разногласия относительно механизма данного феномена. Исследователи сходятся во мнении относительно того, что именно генерация АФК является причиной увеличенной цитотоксичности, однако, конкретный тип радикалов достоверно не определён. В одних работах говорят о генерации гидроксильного радикала [154], в других – перекиси водорода [155]. Предполагаемый нами механизм реакции будет рассмотрен ниже. Различия же в эффектах, даваемых различными антиоксидантами, могут быть объяснены их растворимостью в водных растворах: аскорбат полностью растворим, в то время как токоферол малорастворим, ведь основная его задача – бороться с перекисным окислением липидов в мембранах. Таким образом, можно заключить, что эффект усиления цитотоксичности

характерен именно для соединений меди и может вызываться водорастворимыми антиоксидантами, в особенности содержащими в своем составе тиольную группу.

Дальнейшие эксперименты были направлены на выявление влияния взаимодействия медьсодержащих соединений и N-ацетилцистеина на клеточную популяцию. Они показали, что опухолевые клетки погибают достаточно быстро: за первые 9 часов после добавления комбинации практически вся клеточная популяция окрашивается пропидия иодидом. Исследование окислительного стресса с помощью CM-H₂DCFDA показало, что клеточной гибели предшествует формирование огромного количества АФК, образующихся из-за взаимодействий меди и НАС. Причем это происходит за несколько часов до появления первых мертвых клеток. Быстрая клеточная гибель также может рассматриваться как преимущество данной комбинации, так как реализация именно цитотоксического, а не цитостатического действия не даёт клеткам времени на формирование новых механизмов устойчивости [10].

Кроме того, клетки, подвергшиеся воздействию комбинации, демонстрируют изменения в различных характеристиках как на молекулярном, так и на клеточном уровне. Начнем с того, что нарушается структура и функционирование митохондрий. Было показано, что уже через 4 часа после добавления комбинации митохондриальный потенциал начинает падать, а нарушение морфологии наблюдаются ещё раньше. Сопоставив это с данными по генерации АФК, можно прийти к выводу о том, что не нарушение функции митохондрий является их источником, а наоборот, накопление АФК изменяет активность этих органелл.

Дальнейшее исследование, направленное на определение механизма клеточной гибели, установило наличие признаков сразу нескольких типов. Во-первых, окрашивание AnnexinV-FITC/PI выявляет индукцию апоптоза (появление фосфотидилсерина на внешней стороне плазматической мембраны клетки) спустя 4 и 6 часов после добавления комбинации к клеткам ХМЛ (K562). Спустя 24 часа клеточная популяция окрашивается обоими красителями, что соответствует полной гибели. Также для адгезионных клеточных культур

MDA-MB-231 и HCT116 наблюдались пертурбации в распределении фаз клеточного цикла, накопление клеток в фазе subG1, что также говорит в пользу апоптоза. Тем не менее, дальнейшее прямое изучение индукции проапоптотических маркеров методами иммуноокрашивания и иммуноблоттинга не выявило расщеплённых форм ни каспазы-3, ни PARP. Эти данные свидетельствуют о том, что механизмом клеточной гибели не является классический апоптоз, что не согласуется с предыдущим исследованием [110]. Возможно, что отличия связаны с использованием авторами соли меди, в то время как в нашем исследовании применялись наночастицы и медьорганические комплексы.

Другой тип гибели клеток, который может прогрессировать без активации каспаз, — это некроптоз. Данный тип гибели хоть и приводит к некрозу клеток, однако, относится к программируемому типу клеточной смерти, что означает наличие системы его регуляции. Некростатин-1, ингибитор RIPK1, не предотвращает гибель клеток при обработке комбинацией, следовательно, некроптозной гибели клеток не происходит. Ферроптоз во многом зависит от наличия АФК. Он ингибируется жирорастворимыми антиоксидантами, такими как токоферол или убихинон. В нашем случае токоферол не влияет на цитотоксичность комбинации, что исключает ферроптоз в качестве альтернативной гипотезы. Подробнее с результатами клеточных экспериментов можно ознакомиться в работе [156].

Таким образом, ни один из известных типов программируемой клеточной гибели не удовлетворяет критериям, наблюдаемым в нашем исследовании. Кроме того, необходимо учитывать тот факт, что накопление наночастиц внутри клеток невелико и составляет лишь несколько процентов от изначального количества добавленных. Это в свою очередь означает, что генерация АФК происходит во внеклеточном пространстве. Медьорганические комплексы способны проникать внутрь клеток, однако, их взаимодействие с N-ацетилцистеином также не приводит к активации каспаз или расщеплению PARP, что вероятно указывает на реализацию того же механизма гибели, что и для реакции наночастиц с НАС. Это

позволяет сделать вывод о вероятной некротической природе клеточной гибели, вызванной быстрым повреждением плазматической мембраны активными формами кислорода. Данный вывод частично подтверждается экспериментами на искусственных мембранах, в которых удалось выявить негативное влияние комбинации, составленной из отрицательно заряженных остатков фосфолипидов. Возможно, что недавно открытый механизм купроптоза также может объяснить наблюдаемые эффекты, данное предположение нуждается в дополнительной проверке. В данный момент, опираясь на зависимость этого механизма гибели от уровня липоилирования внутриклеточных белков, можно предположить, что он не проявляется в наших условиях, так как значения IC_{50} практически одинаковы для различных клеточных культур. В наших экспериментах не было выявлено клеточных культур, у которых проявлялись бы признаки устойчивости, что было описано в оригинальной статье [65]. Кроме того, добавление глюкозы в ростовую среду должно повышать выживаемость клеток, чего нами также не наблюдалось. Следует продолжить исследования в этом направлении, в частности, определённый интерес представляет возможность предотвращения купроптоза ингибированием митохондриальных комплексов I/III такими веществами как антимицин или ротенон.

С химической точки зрения взаимодействие компонентов комбинации приводит к восстановлению иона двухвалентной меди, с последующим его участием в реакциях Габера-Вейса, что приводит к генерации АФК. Ранее было показано, что наиболее вероятным продуктом реакции является перекись водорода [110, 147]. Эксперименты на искусственных мембранах показали, что окислительный стресс приводит к нарушению их проницаемости, в особенности если мембрана состоит из отрицательно заряженных остатков фосфолипидов. Вероятно, липидный состав мембран определяет эффективность цитотоксического эффекта комбинации.

Таким образом, в нашей работе были получены данные, которые во многом схожи с имеющимися, однако в некоторых местах им противоречащие или дополняющие. Эффект усиления цитотоксичности медьсодержащих соединений в

присутствии N-ацетилцистеина [110], аскорбата [47] или дисульфирама [157] был описан, однако имеются данные и об обратном действии, то есть супрессии цитотоксичности меди в присутствии NAC [158, 159]. NAC также снижает уровень липопротеинов низкой плотности, окисленных сульфатом меди [160]. В некоторых работах говорится о том, что NAC не влияет на цитотоксичность медных комплексов *in vitro* [161]. Наша работа чётко указывает на то, что эффект взаимодействия присутствует, а расхождения в литературе могут вызываться различиями экспериментальных условий или окислительно-восстановительными свойствами аскорбата и NAC, что позволяет им выступать как в роли анти-, так и прооксидантов [162, 163, 164, 165].

Исследования на животных и клинические испытания комбинации были проведены для глюконата меди и дисульфирама. Несмотря на отдельные доказательства данного подхода в экспериментах на мышах [166, 167], большинство клинических исследований дали умеренные результаты [168]. Эксперименты с соединениями меди в комбинации с NAC *in vivo* ранее не проводились. В нашем исследовании на мышах Balb/c определена острая токсичность, а также оптимальные дозы для дальнейшего применения. Наночастицы CuO, NAC, медьорганический комплекс и их комбинации вводились внутривентриально, после чего проводилось наблюдение за поведением грызунов, их общим состоянием и выживаемостью. Для наночастиц зафиксированная оптимальная доза для внутривентриального введения находится в пределах 3 мг/кг, для NAC – 800 мг/кг, для медьорганического комплекса – 6,125 мг/кг.

Определение противоопухолевой эффективности не позволило выявить значимого увеличения продолжительности жизни мышей, однако, удалось зафиксировать торможение скорости роста опухоли, сравнимое с таковым для конвенционального металлсодержащего препарата цисплатин. Такой эффект, торможение скорости роста опухоли при одновременном отсутствии увеличения продолжительности жизни, может быть связан со слабым действием комбинации на опухолевые клетки асцита из-за их высокой концентрации. При этом, вероятно,

что вначале эксперимента, когда клеток ещё мало, погибает их значительная часть из-за чего рост кривой массы опухоли происходит медленнее нежели в контроле.

Таким образом, комбинация медьсодержащих соединений и восстановителей является перспективным средством борьбы с лекарственной устойчивостью опухолевых клеток, с локальными полостными метастазами и может рассматриваться как средство для терапии терминальных опухолей. Высокая эффективность позволяет добиться быстрой гибели опухолевых клеток, причем в обход классических механизмов апоптоза, что препятствует формированию вторичной резистентности. Подбор наиболее эффективных комбинаций веществ, дозировок и режимов введения является логичным продолжением исследования и позволит разработать подход, который будет эффективен как в *in vitro*, так и в *in vivo* условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Химиотерапия опухолей активно развивается. Создаются препараты, позволяющие значительно увеличить результаты терапии. Однако, при всех успехах остаётся одно существенное препятствие, а именно – формирование лекарственной устойчивости. Различные молекулярные механизмы позволяют клеткам выживать, давая начало рецидиву. Такая опухоль становится частично либо полностью невосприимчивой к прежним стратегиям лечения, что значительно усложняет результаты лечения больных.

Для элиминации опухоли с фенотипом лекарственной устойчивости необходимо задействовать несколько путей реализации гибели. Одним из таких воздействий является кислородный “взрыв” – интенсивное внутриклеточное окисление, повреждающее макромолекулы, нарушающее функции органелл и, в итоге, приводящее к гибели клетки. В нашем исследовании изучались свойства комбинаций различных медьсодержащих и тиоловых соединений в контексте их использования в качестве эффективного средства преодоления лекарственной устойчивости трансформированных клеток в культуре и при экспериментальной терапии лабораторных животных с трансплантированной опухолью.

Начальные этапы работы позволили установить цитотоксичность НЧ CuO в присутствии и в отсутствии NAC. Оказалось, что добавление антиоксиданта уменьшает значения IC₅₀ для наночастиц на два-три порядка. Данный эффект характерен для всех протестированных клеточных культур и сохраняется даже для тех, которые обладают признаками лекарственной устойчивости.

Другие протестированные соединения переходных металлов, которые включали железо, цинк, кобальт и молибден, не проявляли таких свойств, что позволяет судить об уникальности меди в этом отношении. В то же время этот металл может восстанавливаться не только NAC или другими тиолсодержащими соединениями, но и другими физиологическими восстановителями, например, витамином С (аскорбат). Токоферол не усиливал цитотоксичность НЧ CuO, что, вероятно, связано с его слабым потенциалом восстановления.

Определение кинетики гибели клеток позволило установить быстроту этого процесса: уже в первые часы после добавления комбинации выявлены окрашиваемые пропидия иодидом клетки. Через 9 часов эта фракция составляла уже 80% от общего числа клеток в популяции. Также удалось выявить индукцию окислительного стресса окрашиванием CM-H₂DCFDA. Исследование клеточной гибели выявило признаки сразу нескольких механизмов, включая апоптоз, ферроптоз и некроз. Действительно, окрашивание аннексином V/пропидия иодидом выявило индукцию апоптоза. Также в пользу этого механизма говорило изменение распределения фаз клеточного цикла, изменение морфологии митохондрий и падение митохондриального электрического потенциала. Однако, отсутствие активации каспазы-3 и расщепления PARP, которые определены методами иммуноблоттинга и иммуноцитохимии, опровергло эту гипотезу. Предположение о развитии некроптоза также не подтверждено экспериментами с некростатином-1. Ферроптоз должен предотвращаться добавлением токоферола, чего не наблюдалось в наших экспериментах. Также выявление слабого накопления частиц внутри клеток и нарушения проницаемости искусственных липидных бислоев при добавлении комбинации позволило заключить, что наиболее вероятным механизмом гибели клеток, вызванным комбинацией медьсодержащих соединений и NAC, является некроз. Данное предположение может объяснить и быструю гибель клеток, и результаты окрашивания аннексином-V/пропидия иодидом.

Изучая химическую природу взаимодействия компонентов, удалось прийти к заключению о том, что тиольные группы в результате реакции с медьсодержащими веществами окисляются, в результате чего их становится невозможно зарегистрировать методом Элмана. Кроме того, электрохимическими методами выявлено быстрое восстановление меди (II) до одновалентной в присутствии NAC.

Наконец, исследование активности комбинаций медьсодержащих соединений и NAC на мышах Balb/c позволило, во-первых, выявить оптимальные нетоксичные дозы для внутрибрюшинного введения, а, во-вторых, определить

противоопухолевую эффективность комбинации на модели асцитной опухоли Эрлиха. Применение комбинации не оказало значимого влияния на продолжительность жизни животных, однако, выявлено достоверное торможение роста опухоли после введения комбинации на 2-е сутки после прививки опухолевых клеток. Возможно, необходимы многократные введения для значимого пролонгированного эффекта.

Таким образом, основной результат исследования – выявление эффекта значительного (до 3-х порядков (по соотношению 50%-х рост-ингибирующих концентраций до и после воздействия)) усиления цитотоксичности медьсодержащих веществ (НЧ, солей и органических комплексов) при добавлении восстановителей за счёт генерации АФК и быстрого повреждения плазматической и других мембран, что приводит к гибели клеток в первые часы воздействия. Клетки с фенотипами лекарственной устойчивости также оказываются чувствительны к АФК-индуцированным стимулам.

Потенциал стратегии лечения опухолей на основе электрохимического генерирования АФК высок. Требуются доклинические испытания для подбора оптимального режима и способов введения. Представляется рациональным создание органотропных медьсодержащих соединений, цитотоксичность которых будет существенно усиливаться в присутствии восстановителей. Следует подчеркнуть, что установленный в диссертации механизм гибели опухолевых клеток показан в терминальной стадии, когда механизмы апоптоза не функционируют и, следовательно, возможности апоптогенных химиотерапевтических подходов исчерпаны.

Результаты работы опубликованы в 3-х научных статьях в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science. Получен патент Российской Федерации на изобретение «Применение композиции наночастиц оксида меди и N-ацетилцистеина для индукции гибели клеток хронического миелоидного лейкоза». Результаты работы представлены в виде устных и постерных докладов на 15 конференциях всероссийского и международного уровня.

ВЫВОДЫ

1. Тиолсодержащие соединения (N-ацетилцистеин, глутатион, цистеин) и аскорбат усиливают цитотоксичность оксида, солей и органических комплексов меди (II). Усиление находится в диапазоне от 3-5 до 900 раз (по соотношению 50%-х рост-ингибирующих концентраций до и после воздействия) и проявляется независимо от тканевой принадлежности клеток. Синергическое действие вызывается при введении соединений Cu(II) и восстановителей в концентрациях 5-40 нмоль/л и 2,5 ммоль/л, соответственно; в этих концентрациях компоненты нетоксичны при раздельном применении. Родительские линии и изогенные сублинии клеток с лекарственной устойчивостью одинаково чувствительны к указанным комбинациям.

2. Потенцирование цитотоксичности добавлением тиоловых соединений и аскорбата выявлено только для соединений меди (II). В случае других переходных металлов (железо, цинк, кобальт, молибден) синергический эффект отсутствовал.

3. С помощью исследования взаимодействия между Cu(II) и N-ацетилцистеином методами циклической вольтамперометрии и вращающегося дискового электрода по электрохимическим показателям тока окисления и восстановления установлено, что цитотоксичные АФК образуются в процессе восстановления меди (II) до одновалентного состояния с последующим участием Cu^+ в реакциях Габера-Вейса и Фентона.

4. Первоначальные признаки гибели клеток под влиянием комбинации медьорганических соединений (5-40 нмоль/л) и N-ацетилцистеина (2,5 ммоль/л) проявляются через 4-8 ч после добавления и сопровождаются окислительным повреждением плазматической мембраны, а также снижением электрического потенциала митохондрий на 70% без характерной для апоптоза протеолитической активации поли(АДФрибозо)полимеразы и каспазы-3. Повреждение мембран – ведущий фактор гибели родительских клеток и сублиний с лекарственной устойчивостью.

5. Максимальная переносимая доза лидерного медьорганического комплекса [(Z)-3-(2-флуорофенил)-2-метилтио-5-(пиридин-2-илметил)-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-он]медь(II) дихлорида (FS-Me+2) и N-ацетилцистеина для самок мышей породы Balb/c - 6,25 и 400 мг/кг массы тела, соответственно, при трёхкратном внутрибрюшинном введении. Однократное введение комбинации FS-Me+2 и N-ацетилцистеина животным с асцитной аденокарциномой Эрлиха приводит к статистически достоверному торможению роста опухоли на 52% через 23 дня после введения. Величина этого показателя сопоставима с эффективностью клинического химиопрепарата цисплатина.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Holohan C. Cancer drug resistance: an evolving paradigm / C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, D. B. Longley, P. G. Johnston // *Nature Reviews Cancer*. – 2013. – Т. 13. – №. 10. – С. 714-726.
2. Boehm T. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance / T. Boehm, J. Folkman, T. Browder, M. S. O'Reilly // *Nature*. – 1997. – Т. 390. – №. 6658. – С. 404-407.
3. Mansoori B. The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review / B. Mansoori, A. Mohammadi, S. Davudian, S. Shirjang, B. Baradaran // *Advanced pharmaceutical bulletin*. – 2017. – Т. 7. – №. 3. – С. 339.
4. Prieto-Vila M. Drug resistance driven by cancer stem cells and their niche / M. Prieto-Vila, R. U. Takahashi, W. Usuba, I. Kohama, T. Ochiya // *International journal of molecular sciences*. – 2017. – Т. 18. – №. 12. – С. 2574.
5. Zahreddine H., Borden K. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer/ H. Zahreddine, K. L. Borden // *Frontiers in pharmacology*. – 2013. – Т. 4. – С. 28.
6. Vasan N. A view on drug resistance in cancer / N. Vasan, J. Baselga, D. M. Hyman // *Nature*. – 2019. – Т. 575. – №. 7782. – С. 299-309.
7. Parrish K. E. Improving drug delivery to primary and metastatic brain tumors: strategies to overcome the blood–brain barrier / K. E. Parrish, J. N. Sarkaria, W. F. Elmquist // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2015. – Т. 97. – №. 4. – С. 336-346.
8. Welter M. Interstitial fluid flow and drug delivery in vascularized tumors: a computational model / M. Welter, H. Rieger // *PloS one*. – 2013. – Т. 8. – №. 8. – С. e70395.
9. Peetla C. Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles / C. Peetla, S. Vijayaraghavalu, V. Labhasetwar // *Advanced drug delivery reviews*. – 2013. – Т. 65. – №. 13-14. – С. 1686-1698.

10. Redmond K. M. Resistance mechanisms to cancer chemotherapy / K. M. Redmond, T. R. Wilson, P. G. Johnston, D. B. Longley // *Frontiers in Bioscience-Landmark*. – 2008. – T. 13. – №. 13. – C. 5138-5154.
11. Wright N. J. Methotrexate recognition by the human reduced folate carrier SLC19A1 / N. J. Wright, J. G. Fedor, H. Zhang, P. Jeong, Y. Suo, J. Yoo, J. Hong, W. Im, S.-Y. Lee // *Nature*. – 2022. – T. 609. – №. 7929. – C. 1056-1062.
12. Gifford A. J. Role of the E45K-reduced folate carrier gene mutation in methotrexate resistance in human leukemia cells / M. Haber, T. L. Witt, J. R. Whetstone, J. W. Taub, L. H. Matherly, M. D. Norris // *Leukemia*. – 2002. – T. 16. – №. 12. – C. 2379-2387.
13. Chen C. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells / C. J. Chen, J. E. Chin, K. Ueda, D. P. Clark, I. Pastan, M. M. Gottesman, & I. B. Roninson // *Cell*. – 1986. – T. 47. – №. 3. – C. 381-389.
14. Cole S. P. C. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a “multitasking” ATP-binding cassette (ABC) transporter / S. P. C. Cole // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – T. 289. – №. 45. – C. 30880-30888.
15. Nakanishi T. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression / Nakanishi T., Ross D // *Chinese journal of cancer*. – 2012. – T. 31. – №. 2. – C. 73.
16. Li F. MRP1-targeted near infrared photoimmunotherapy for drug resistant small cell lung cancer / C. Mao, S. Yeh, Y. Sun, J. Xin, Q. Shi, X. Ming // *International journal of pharmaceutics*. – 2021. – T. 604. – C. 120760.
17. Dong Q. Lactate-induced MRP1 expression contributes to metabolism-based etoposide resistance in non-small cell lung cancer cells / Q. Dong, C. Zhou, H. Ren, Z. Zhang, F. Cheng, Z. Xiong, C. Chen, J. Yang, J. Gao, Y. Zhang, L. Xu, J. Fang, Y. Cao, H. Wei, Z. Wu // *Cell Communication and Signaling*. – 2020. – T. 18. – №. 1. – C. 1-18.

18. Michael M. Tumoral drug metabolism: overview and its implications for cancer therapy / M. M. Michael, M. M. Doherty // *Journal of Clinical Oncology*. – 2005. – T. 23. – №. 1. – C. 205-229.
19. Vredenburg G. Activation of the anticancer drugs cyclophosphamide and ifosfamide by cytochrome P450 BM3 mutants / G. Vredenburg, S. den Braver-Sewradj, B. M. van Vugt-Lussenburg, N. P. Vermeulen, J. N. Commandeur, & J. C. Vos // *Toxicology letters*. – 2015. – T. 232. – №. 1. – C. 182-192.
20. Strange R. C. Glutathione-S-transferase family of enzymes / R. C. Strange, M. A. Spiteri, S. Ramachandran, A. A. Fryer // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2001. – T. 482. – №. 1-2. – C. 21-26.
21. Townsend D. M. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance / D. M. Townsend, K. D. Tew // *Oncogene*. – 2003. – T. 22. – №. 47. – C. 7369-7375.
22. Harshbarger W. Structural and biochemical analyses reveal the mechanism of glutathione S-transferase Pi 1 inhibition by the anti-cancer compound piperlongumine / W. Harshbarger, S. Gondi, S. B. Ficarro, J. Hunter, D. Udayakumar, D. Gurbani, W. D. Singer, Y. Liu, L. Li, J. A. Marto, K. D. Westover // *Journal of biological chemistry*. – 2017. – T. 292. – №. 1. – C. 112-120.
23. Hu D. G. Genetic polymorphisms of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) genes and cancer risk / D. G. Hu, P. I. Mackenzie, R. A. McKinnon, R. Meech // *Drug Metabolism Reviews*. – 2016. – T. 48. – №. 1. – C. 47-69.
24. Lazarus P. Potential role of UGT pharmacogenetics in cancer treatment and prevention: focus on tamoxifen / P. Lazarus, A. S. Blevins-Primeau, Y. Zheng, D. Sun // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2009. – T. 1155. – №. 1. – C. 99-111.
25. Fernald K. Evading apoptosis in cancer / K. Fernald, M. Kurokawa // *Trends in cell biology*. – 2013. – T. 23. – №. 12. – C. 620-633.

26. Neophytou C. M. Apoptosis deregulation and the development of cancer multi-drug resistance / C. M. Neophytou, I. P. Trougakos, N. Erin, P. Papageorgis // *Cancers*. – 2021. – T. 13. – №. 17. – C. 4363.
27. Mataga M.A. Anti-breast cancer effects of histone deacetylase inhibitors and calpain inhibitor / M. A. Mataga, S. Rosenthal, S. Heerboth, A. Devalapalli, S. Kokolus, L. R. Evans, M. Longacre, G. Housman, S. Sarkar // *Anticancer research*. – 2012. – T. 32. – №. 7. – C. 2523-2529.
28. Soria J. C. Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer / J.C. Soria, E. Smit, D. Khayat, B. Besse, X. Yang, C.P. Hsu, D. Reese, J. Wiezorek, F. Blackhall // *Journal of Clinical Oncology*. – 2010. – T. 28. – №. 9. – C. 1527-1533.
29. Tafani M. Modulators of HIF1 α and NF κ B in cancer treatment: is it a rational approach for controlling malignant progression? / M. Tafani, B. Pucci, A Russo, L. Schito, L. Pellegrini, G.A. Perrone, L. Villanova, L. Salvatori, L. Ravenna E. Petrangeli, M.A. Russo // *Frontiers in Pharmacology*. – 2013. – T. 4. – C. 13.
30. Nathanson D. A. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA / D.A. Nathanson, B. Gini, J. Mottehedeh, K. Visnyei, T. Koga, G. Gomez, A. Eskin, K. Hwang, J. Wang, K. Masui, A. Paucar, H. Yang, M. Ohashi, S. Zhu, J. Wykosky, R. Reed, S. F. Nelson, T. F. Cloughesy, C. D. James, P. N. Rao, H. I. Kornblum, J. R. Heath, W. K. Cavenee, F. B. Furnari, P. S. Mischel // *Science*. – 2014. – T. 343. – №. 6166. – C. 72-76.
31. Pal B. Stem cell altruism may serve as a novel drug resistance mechanism in oral cancer / P. Bidisha, Bayat-Mokhtari R., L. Hong, B. Rashmi, T. Joyeeta, S. Sora, S. Anupam, T. Wael, B. Seema, G. Sukanya, Katakaki C. Amal, B. Debabrata, Y. Herman, Felsher W. Dean, D. Bikul // *Cancer Research*. – 2016. – T. 76. – №. 14_Supplement. – C. 251-251.
32. Parkin B. Clonal evolution and devolution after chemotherapy in adult acute myelogenous leukemia / Brian Parkin, Peter Ouillette, Yifeng Li, Jennifer Keller, Cindy Lam, Diane Roulston, Cheng Li, Kerby Shedden, Sami N. Malek // *Blood*,

- The Journal of the American Society of Hematology. – 2013. – T. 121. – №. 2. – C. 369-377.
33. Batlle E. Cancer stem cells revisited / E. Batlle, H. Clevers // *Nature medicine*. – 2017. – T. 23. – №. 10. – C. 1124-1134.
34. Cepeda V. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity / V. Cepeda, M. A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo, J. M. Pérez // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. – 2007. – T. 7. – №. 1. – C. 3-18.
35. Housman G. Drug resistance in cancer: an overview / G. Housman, S. Byler, S. Heerboth, K. Lapinska, M. Longacre, N. Snyder, S. Sarkar // *Cancers*. – 2014. – T. 6. – №. 3. – C. 1769-1792.
36. Helleday T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance / T. Helleday // *Carcinogenesis*. – 2010. – T. 31. – №. 6. – C. 955-960.
37. Stefanski C. D. APC loss affects DNA damage repair causing doxorubicin resistance in breast cancer cells / C. D. Stefanski, K. Keffler, S. McClintock, L. Milac, J. R. Prospero // *Neoplasia*. – 2019. – T. 21. – №. 12. – C. 1143-1150.
38. Gavande N. S. DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? / N. S. Gavande, P. S. V. Vere-Carozza, H. D. Hinshaw, S. I. Jalal, C. R. Sears, K. S. Pawelczak, J. J. Turchi // *Pharmacology & therapeutics*. – 2016. – T. 160. – C. 65-83.
39. Meier P. Apoptosis in development / P. Meier, A. Finch, G. Evan // *Nature*. – 2000. – T. 407. – №. 6805. – C. 796-801.
40. Morana O., The apoptosis paradox in cancer / W. Wood, C.D. Gregory // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – T. 23. – №. 3. – C. 1328.
41. Green D. R. Mitochondria and apoptosis / D.R. Green, J.C. Reed // *Science*. – 1998. – T. 281. – №. 5381. – C. 1309-1312.
42. Ashkenazi A. Death receptors: signaling and modulation / A. Ashkenazi, V.M. Dixit // *Science*. – 1998. – T. 281. – №. 5381. – C. 1305-1308.

43. Brentnall M. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis / M. Brentnall, L. Rodriguez-Menocal, R. L. De Guevara, E. Cepero, L. H. Boise // *BMC cell biology*. – 2013. – T. 14. – C. 1-9.
44. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review / E. Obeng // *Brazilian Journal of Biology*. – 2020. – T. 81. – C. 1133-1143.
45. Hengartner M. O. The biochemistry of apoptosis / M.O. Hengartner // *Nature*. – 2000. – T. 407. – №. 6805. – C. 770-776.
46. Reed J. C. Mechanisms of apoptosis / J.C. Reed // *The American journal of pathology*. – 2000. – T. 157. – №. 5. – C. 1415-1430.
47. Kaufmann S. H. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy / S.H. Kaufmann, W.C. Earnshaw // *Experimental cell research*. – 2000. – T. 256. – №. 1. – C. 42-49.
48. Proskuryakov S. Y. Necrosis: a specific form of programmed cell death? / S.Y. Proskuryakov, A.G. Konoplyannikov, V.L. Gabai // *Experimental cell research*. – 2003. – T. 283. – №. 1. – C. 1-16.
49. Tonnus W. The pathological features of regulated necrosis / W. Tonnus, C. Meyer, A. Paliege, A. Belavgeni, A. von Mässenhausen, S.R. Bornstein, C. Hugo, J.U. Becker, A. Linkermann // *The Journal of pathology*. – 2019. – T. 247. – №. 5. – C. 697-707.
50. Waters J. P. Tumour necrosis factor and cancer / J. P. Waters, J.S. Pober, J.R. Bradley // *The Journal of pathology*. – 2013. – T. 230. – №. 3. – C. 241-248.
51. Carswell E. A. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors / E. Carswell, L.J. Old, R. Kassel, S. Green, N. Fiore, B. Williamson // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1975. – T. 72. – №. 9. – C. 3666-3670.
52. Green S. Partial purification of a serum factor that causes necrosis of tumors / S. Green, A. Dobrjansky, E.A. Carswell, R.L. Kassel, L.J. Old, N. Fiore, M.K. Schwartz // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1976. – T. 73. – №. 2. – C. 381-385.

- 53.Илюшин А. Л. Результаты открытого сравнительного исследования в параллельных группах по оценке эффективности и безопасности лекарственного препарата Рефнот®(фактор некроза опухолей-тимозин-1 альфа рекомбинантный) в лечении диссеминированного тройного негативного рака молочной железы / А.Л. Илюшин, Я.Л. Красная, П. И. Шабалкин // Медицина. – 2019. – Т. 7. – №. 3. – С. 138-149.
- 54.Karsch-Bluman A. Tissue necrosis and its role in cancer progression / A. Karsch-Bluman, A. Feiglin, E. Arbib, T. Stern, H. Shoval, O. Schwob, M. Berger, O. Benny // Oncogene. – 2019. – Т. 38. – №. 11. – С. 1920-1935.
- 55.Tang D. The molecular machinery of regulated cell death / D. Tang, R. Kang, T. Van Berghe, P. Vandenabeele, G. Kroemer // Cell research. – 2019. – Т. 29. – №. 5. – С. 347-364.
- 56.Galluzzi L. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, ... M. Campanella // Cell Death & Differentiation. – 2018. – Т. 25. – №. 3. – С. 486-541.
- 57.Chen D. Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer / D. Chen, J. Yu, L. Zhang // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer. – 2016. – Т. 1865. – №. 2. – С. 228-236.
- 58.Pasparakis M. Necroptosis and its role in inflammation / M. Pasparakis, P. Vandenabeele // Nature. – 2015. – Т. 517. – №. 7534. – С. 311-320.
- 59.Gong Y. The role of necroptosis in cancer biology and therapy / Y. Gong, Z. Fan, G. Luo, C. Yang, Q. Huang, K. Fan, H. Cheng, K. Jin, Q. Ni, X. Yu, C. Liu // Molecular cancer. – 2019. – Т. 18. – №. 1. – С. 1-17.
- 60.Najafov A. Necroptosis and cancer / A. Najafov, H. Chen, J. Yuan // Trends in cancer. – 2017. – Т. 3. – №. 4. – С. 294-301.
- 61.Lemberg K. Ferroptosis: A Novel Form of Cancer Cell Death Induced by the Small Molecule Erastin / K. Lemberg // дис. – Columbia University, 2011.
- 62.Dixon S. J. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death / S.J. Dixon, K.M. Lemberg, M.R. Lamprecht, R. Skouta, E.M. Zaitsev, C.E. Gleason,

- D.N. Patel, A.J. Bauer, A.M. Cantley, W.S. Yang, B. Morrison III, B.R. Stockwell // *Cell*. – 2012. – T. 149. – №. 5. – C. 1060-1072.
63. Shimada K. Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis / K. Shimada // *Nature chemical biology*. – 2016. – T. 12. – №. 7. – C. 497-503.
64. Li J. Ferroptosis: past, present and future / J. Li, F. Cao, H. Yin, Z. Huang, Z. Lin, N. Mao, B. Sun, G. Wang // *Cell death & disease*. – 2020. – T. 11. – №. 2. – C. 88.
65. Tsvetkov P. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins / P. Tsvetkov, S. Coy, B. Petrova, M. Dreishpoon, A. Verma, M. Abdusamad, J. Rossen, L. Joesch-Cohen, R. Humeidi, R.D. Spangler, J.K. Eaton, E. Frenkel, M. Kocak, S.M. Corsello, S. Lutsenko, N. Kanarek, S. Santagata, T.R. Golub // *Science*. – 2022. – T. 375. – №. 6586. – C. 1254-1261.
66. Sies H. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology / H. Sies, V.V. Belousov, N.S. Chandel, M.J. Davies, D.P. Jones, G.E. Mann, M.P. Murphy, M. Yamamoto, C. Winterbourn // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2022. – T. 23. – №. 7. – C. 499-515.
67. Bayr H. Reactive oxygen species / H. Bayr // *Critical care medicine*. – 2005. – T. 33. – №. 12. – C. S498-S501.
68. Mittler R. ROS are good / R. Mittler // *Trends in plant science*. – 2017. – T. 22. – №. 1. – C. 11-19.
69. Zorov D. B. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release / D. B. Zorov, M. Juhaszova, S. J. Sollott // *Physiological reviews*. – 2014. – T. 94. – №. 3. – C. 909-950.
70. Jakubczyk K. Reactive oxygen species-sources, functions, oxidative damage / K. Jakubczyk, K. Dec, J. Kałduńska, D. Kawczuga, J. Kochman, K. Janda. // *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. – 2020. – T. 48. – №. 284. – C. 124-127.
71. Privett A. J. Exploring water radiolysis in proton cancer therapy: Time-dependent, non-adiabatic simulations of $H^{++}(H_2O)$ 1-6 / A.J. Privett, E.S.

- Teixeira, C. Stopera, J.A. Morales // PLoS One. – 2017. – T. 12. – №. 4. – C. e0174456.
- 72.Srinivas U. S. ROS and the DNA damage response in cancer / U. S. Srinivas, B. W. Tan, B. A. Vellayappan, A. D. Jeyasekharan // Redox biology. – 2019. – T. 25. – C. 101084.
- 73.Zhang J. ROS and ROS-mediated cellular signaling / J. Zhang, X. Wang, V. Vikash, Q. Ye, D. Wu, Y. Liu, W. Dong // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2016. – T. 2016.
- 74.Ray P. D. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling / P. D. Ray, B. W. Huang, Y. Tsuji // Cellular signalling. – 2012. – T. 24. – №. 5. – C. 981-990.
- 75.Yang Y. Mitochondria and mitochondrial ROS in cancer: novel targets for anticancer therapy / Y. Yang, S. Karakhanova, W. Hartwig, J.G. D'Haese, P.P. Philippov, J. Werner, A.V. Bazhin // Journal of cellular physiology. – 2016. – T. 231. – №. 12. – C. 2570-2581.
- 76.Wang J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question / J. Wang, J. Yi // Cancer biology & therapy. – 2008. – T. 7. – №. 12. – C. 1875-1884.
- 77.Moloney J. N. ROS signalling in the biology of cancer / J.N. Moloney, T.G. Cotter // Seminars in cell & developmental biology. – Academic Press, 2018. – T. 80. – C. 50-64.
- 78.Lou Y. W. Redox regulation of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in cancer cells / Y.W. Lou, Y.Y. Chen, S.F. Hsu, R.K. Chen, C.L. Lee, K.H. Khoo, N.K. Tonks, T.C. Meng // The FEBS journal. – 2008. – T. 275. – №. 1. – C. 69-88.
- 79.Bellot G. L. ROS, autophagy, mitochondria and cancer: Ras, the hidden master? / G.L. Bellot, D.Liu, S. Pervaiz // Mitochondrion. – 2013. – T. 13. – №. 3. – C. 155-162.
- 80.Seifried H. E. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species / H.E. Seifried, D.E. Anderson, E.I. Fisher, J.A. Milner // The Journal of nutritional biochemistry. – 2007. – T. 18. – №. 9. – C. 567-579.

81. Li J. Evaluation and monitoring of superoxide dismutase (SOD) activity and its clinical significance in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis / J. Li, J. Lei, L. He, X. Fan, F. Yi, W. Zhang // *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. – 2019. – T. 25. – C. 2032.
82. Nelson S. K. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy / S.K. Nelson, S.K. Bose, G.K. Grunwald, P. Myhill, J.M. McCord // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2006. – T. 40. – №. 2. – C. 341-347.
83. Venkataraman S. Manganese superoxide dismutase overexpression inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer cells / S. Venkataraman, X. Jiang, C. Weydert, Y. Zhang, H.J. Zhang, P.C. Goswami, J.M. Ritchie, L.W. Oberley & Garry R Buettner // *Oncogene*. – 2005. – T. 24. – №. 1. – C. 77-89.
84. Nishikawa M. Inhibition of metastatic tumor growth by targeted delivery of antioxidant enzymes / M. Nishikawa, K. Hyoudou, Y. Kobayashi, Y. Umeyama, Y. Takakura, M. Hashida // *Journal of controlled release*. – 2005. – T. 109. – №. 1-3. – C. 101-107.
85. Pham T. C. Recent strategies to develop innovative photosensitizers for enhanced photodynamic therapy / T.C. Pham, V.N. Nguyen, Y. Choi, S. Lee, J. Yoon // *Chemical Reviews*. – 2021. – T. 121. – №. 21. – C. 13454-13619.
86. Selimovic D. Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2 / D. Selimovic, M. Hassan, Y. Haikel, U.R. Hengge // *Cellular signalling*. – 2008. – T. 20. – №. 2. – C. 311-322.
87. Kirshner J. R. Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress / J.R. Kirshner, S. He; V. Balasubramanyam, J. Kepros; C.-Y. Yang, M. Zhang, Z. Du; J. Barsoum, J. Bertin // *Molecular cancer therapeutics*. – 2008. – T. 7. – №. 8. – C. 2319-2327.
88. Tsang T. Copper biology / T. Tsang, C.I. Davis, D.C. Brady // *Current Biology*. – 2021. – T. 31. – №. 9. – C. R421-R427.

89. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, Gutteridge J.M.C. – Oxford university press, USA, 2015.
90. Abdal Dayem A. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles / A. A. Dayem, M.K. Hossain, S.B. Lee, K. Kim, S.K. Saha, G.M. Yang, H.Y. Choi, S.G. Cho // International Journal Of Molecular Sciences. – 2017. – T. 18. – №. 1. – C. 120.
91. Kurutas E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state / E.B. Kurutas // Nutrition Journal. – 2015. – T. 15. – №. 1. – C. 71.
92. Li Y. Copper homeostasis: Emerging target for cancer treatment / Y. Li // IUBMB Life. – 2020. – T. 72. – №. 9. – C. 1900-1908.
93. Ge E. J. Connecting copper and cancer: from transition metal signalling to metalloplasia / E.J. Ge, A.I. Bush, A. Casini, P.A. Cobine, J.R. Cross, G.M. DeNicola, ... C.J. Chang // Nature Reviews Cancer. – 2022. – T. 22. – №. 2. – C. 102-113.
94. Shanbhag V. C. Copper metabolism as a unique vulnerability in cancer / V.C. Shanbhag, N. Gudekar, K. Jasmer, C. Papageorgiou, K. Singh, M.J. Petris // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2021. – T. 1868. – №. 2. – C. 118893.
95. Wang X. Copper transporter Ctr1 contributes to enhancement of the sensitivity of cisplatin in esophageal squamous cell carcinoma / X. Wang, Q. Lou, T. Fan, Q. Zhang, X. Yang, H. Liu, R. Fan // Translational Oncology. – 2023. – T. 29. – C. 101626.
96. Horn N. Chelating principles in Menkes and Wilson diseases: Choosing the right compounds in the right combinations at the right time / N. Horn, L.B. Møller, V. M. Nurchi, J. Aaseth // Journal of inorganic biochemistry. – 2019. – T. 190. – C. 98-112.
97. Tsai C. Y. Copper influx transporter 1 is required for FGF, PDGF and EGF-induced MAPK signaling / C.Y. Tsai, J.C. Finley, S.S. Ali, H.H. Patel, S.B. Howell // Biochemical pharmacology. – 2012. – T. 84. – №. 8. – C. 1007-1013.

98. Kim Y. J. Copper chaperone ATOX1 is required for MAPK signaling and growth in BRAF mutation-positive melanoma / Y.J. Kim, G.J. Bond, T. Tsang, J.M. Posimo, L. Busino, D.C. Brady // *Metallomics*. – 2019. – T. 11. – №. 8. – C. 1430-1440.
99. Feng W. Copper regulation of hypoxia-inducible factor-1 activity / W. Feng, F. Ye, W. Xue, Z. Zhou, Y. J. Kang // *Molecular pharmacology*. – 2009. – T. 75. – №. 1. – C. 174-182.
100. Finney L. Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression / L. Finney, S. Vogt, T. Fukai, D. Glesne // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. – 2009. – T. 36. – №. 1. – C. 88-94.
101. Khan G. Copper chelation in cancer therapy using tetrathiomolybdate: an evolving paradigm / G. Khan, S. Merajver // *Expert opinion on investigational drugs*. – 2009. – T. 18. – №. 4. – C. 541-548.
102. Sciegenka S. J. D-penicillamine combined with inhibitors of hydroperoxide metabolism enhances lung and breast cancer cell responses to radiation and carboplatin via H₂O₂-mediated oxidative stress / S.J. Sciegenka, S.R. Solst, K.C. Falls, J.D. Schoenfeld, A.R. Klinger, N.L. Ross, S.N. Rodman, D.R. Spitz, M.A. Fath // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2017. – T. 108. – C. 354-361.
103. Chen S. J. et al. Mechanistic basis of a combination D-penicillamine and platinum drugs synergistically inhibits tumor growth in oxaliplatin-resistant human cervical cancer cells in vitro and in vivo / S. J. Chen, C. C. Kuo, H. Y. Pan, T. C. Tsou, S. C. Yeh, J. Y. Chang // *Biochemical pharmacology*. – 2015. – T. 95. – №. 1. – C. 28-37.
104. Yoshii J. et al. The copper-chelating agent, trientine, suppresses tumor development and angiogenesis in the murine hepatocellular carcinoma cells / J. Yoshii, H. Yoshiji, S. Kuriyama, Y. Ikenaka, R. Noguchi, H. Okuda, H. Tsujinoue, T. Nakatani, H. Kishida, D. Nakae, D.E. Gomez, M.S. De Lorenzo, A.M. Tejera, H. Fukui // *International journal of cancer*. – 2001. – T. 94. – №. 6. – C. 768-773.

105. Yin J. Copper chelation by trientine dihydrochloride inhibits liver RFA-induced inflammatory responses in vivo / J. M. Yin, L. B. Sun, J. S. Zheng, X. X. Wang, D. X. Chen, N. Li // *Inflammation Research*. – 2016. – T. 65. – C. 1009-1020.
106. Allensworth J. L. Disulfiram (DSF) acts as a copper ionophore to induce copper-dependent oxidative stress and mediate anti-tumor efficacy in inflammatory breast cancer / L. J. Allensworth, M. K. Evans, F. Bertucci, A. J. Aldrich, R. A. Festa, P. Finetti, N. T. Ueno, R. Safi, D. P. McDonnell, D. J. Thiele, S. Van Laere, G. R. Devi // *Molecular oncology*. – 2015. – T. 9. – №. 6. – C. 1155-1168.
107. Sibuh B. Z. Synthesis, in silico study, and anti-cancer activity of thiosemicarbazone derivatives / B. Z. Sibuh, P. K. Gupta, P. Taneja, S. Khanna, P. Sarkar, S. Pachisia, A. A. Khan, N. K. Jha, K. Dua, S. K. Singh, S. Pandey, P. Slama, K. K. Kesari, & S. Roychoudhury // *Biomedicines*. – 2021. – T. 9. – №. 10. – C. 1375.
108. Kalinowski D. S. Thiosemicarbazones: the new wave in cancer treatment / D. S. Kalinowski, P. Quach, D. R. Richardson // *Future medicinal chemistry*. – 2009. – T. 1. – №. 6. – C. 1143-1151.
109. Khan R. Feasibility of repurposing clioquinol for cancer therapy / R. Khan, H. Khan, Y. Abdullah, Q. P. Dou // *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. – 2020. – T. 15. – №. 1. – C. 14-31.
110. Zheng J. N-Acetylcysteine interacts with copper to generate hydrogen peroxide and selectively induce cancer cell death / J. Zheng, J. R. Lou, X. X. Zhang, D. M. Benbrook, M. H. Hanigan, S. E. Lind, W. Q. Ding // *Cancer letters*. – 2010. – T. 298. – №. 2. – C. 186-194.
111. Mcquitty R. J. Metal-based drugs / R.J. Mcquitty // *Science Progress*. – 2014. – T. 97. – №. 1. – C. 1-19.
112. Allardyce C. S. Metal-based drugs that break the rules / C.S. Allardyce, P.J. Dyson // *Dalton transactions*. – 2016. – T. 45. – №. 8. – C. 3201-3209.

113. Esteban Leon I. Vanadium, ruthenium and copper compounds: a new class of nonplatinum metallodrugs with anticancer activity / I. E. Leon, J. F. Cadavid-Vargas, A. L. Di Virgilio, & S. B. Etcheverry // *Current medicinal chemistry*. – 2017. – T. 24. – №. 2. – C. 112-148.
114. Denoyer D. Targeting copper in cancer therapy: ‘Copper That Cancer’ / D. Denoyer, S. Masaldan, S. La Fontaine, M. A. Cater // *Metallomics*. – 2015. – T. 7. – №. 11. – C. 1459-1476.
115. Pillai G. Nanomedicines for cancer therapy: an update of FDA approved and those under various stages of development. *SOJ Pharm Pharm Sci* 1 (2): 13 / G. Pillai // *Nanomedicines for Cancer Therapy: An Update of FDA Approved and Those under Various Stages of Development*. – 2014.
116. Anselmo A. C. Nanoparticles in the clinic: An update / A. C. Anselmo, S. Mitragotri // *Bioengineering & translational medicine*. – 2019. – T. 4. – №. 3. – C. e10143.
117. Alizadeh S. R. Characterization and anticancer activities of green synthesized CuO nanoparticles, A review / S.R. Alizadeh, M.A. Ebrahimzadeh // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. – 2021. – T. 21. – №. 12. – C. 1529-1543.
118. Azizi M. Cytotoxic effect of albumin coated copper nanoparticle on human breast cancer cells of MDA-MB 231 / M. Azizi, H. Ghourchian, F. Yazdian, F. Dashtestani, H. AlizadehZeinabad // *PloS one*. – 2017. – T. 12. – №. 11. – C. e0188639.
119. Ying S. Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations / S. Ying, Z. Guan, P. C. Ofoegbu, P. Clubb, C. Rico, F. He, & J. Hong // *Environmental Technology Innovation*. – 2022. – T. 26. – C. 102336.
120. Aboeita N. M. Enhanced anticancer activity of nedaplatin loaded onto copper nanoparticles synthesized using red algae / N. M. Aboeita, S. A. Fahmy, M. M. El-Sayed, H. M. E. S. Azzazy, T. Shoeib // *Pharmaceutics*. – 2022. – T. 14. – №. 2. – C. 418.

121. Biresaw S. S. Copper nanoparticles green synthesis and characterization as anticancer potential in breast cancer cells (MCF7) derived from *Prunus nepalensis* phytochemicals / S.S. Biresaw, P. Taneja // *Materials Today: Proceedings*. – 2022. – T. 49. – C. 3501-3509.
122. Gu J. Novel green formulation of copper nanoparticles by *Foeniculum vulgare*: Chemical characterization and determination of cytotoxicity, anti-human lung cancer and antioxidant effects / J. Gu, F. Chen, Z. Zheng, L. Bi, H. Morovvati, S. Goorani // *Inorganic Chemistry Communications*. – 2023. – T. 150. – C. 110442.
123. Zhuang X. Design and synthesis of copper nanoparticles for the treatment of human esophageal cancer: Introducing a novel chemotherapeutic supplement / X. Zhuang, Y. Kang, L. Zhao, S. Guo // *Journal of Experimental Nanoscience*. – 2022. – T. 17. – №. 1. – C. 274-284.
124. Verma N. Synthesis and biomedical applications of copper oxide nanoparticles: an expanding horizon / N. Verma, Kumar N. // *ACS biomaterials science & engineering*. – 2019. – T. 5. – №. 3. – C. 1170-1188.
125. Siddiqui M. A. Copper oxide nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cells / M. A. Siddiqui, H. A. Alhadlaq, J. Ahmad, A. A. Al-Khedhairi, J. Musarrat, M. Ahamed // *PloS one*. – 2013. – T. 8. – №. 8. – C. e69534.
126. Wang Y. Cuprous oxide nanoparticles inhibit prostate cancer by attenuating the stemness of cancer cells via inhibition of the Wnt signaling pathway / Y. Wang, Q. W. Yang, Q. Yang, T. Zhou, M. F. Shi, C. X. Sun, Y. H. Sun // *International Journal of Nanomedicine*. – 2017. – T. 12. – C. 2569.
127. Xue Y. Phyto-mediated synthesized multifunctional Zn/CuO NPs hybrid nanoparticles for enhanced activity for kidney cancer therapy: a complete physical and biological analysis / Y. Xue, G. Yu, Z. Shan, Z. Li // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2018. – T. 186. – C. 131-136.
128. Wang Y. Cuprous oxide nanoparticles selectively induce apoptosis of tumor cells / Y. Wang, X.-Y. Zi, J. Su, H.-X. Zhang, X.-R. Zhang, H.-Y. Zhu, J.-

- X. Li, M. Yin, F. Yang, & Y.-P. Hu // *International journal of nanomedicine*. – 2012. – C. 2641-2652.
129. Wang Y. Cuprous oxide nanoparticles inhibit the growth and metastasis of melanoma by targeting mitochondria / Y. Wang, F. Yang, H.X. Zhang, X.Y. Zi, X.H. Pan, F. Chen, W.D. Luo, J.X. Li, H.Y. Zhu, Y.P. Hu // *Cell death & disease*. – 2013. – T. 4. – №. 8. – C. e783-e783.
130. Song H. Serum adsorption, cellular internalization and consequent impact of cuprous oxide nanoparticles on uveal melanoma cells: implications for cancer therapy / H. Song, Q. Xu, Y. Zhu, S. Zhu, H. Tang, Y. Wang, H. Ren, P. Zhao, Z. Qi, S. Zhao // *Nanomedicine*. – 2015. – T. 10. – №. 24. – C. 3547-3562.
131. Giannousi K. Synthesis and biological evaluation of PEGylated CuO nanoparticles / K. Giannousi, E. Hatzivassiliou, S. Mourdikoudis, G. Vourlias, A. Pantazaki, C. Dendrinou-Samara // *Journal of inorganic biochemistry*. – 2016. – T. 164. – C. 82-90.
132. Santini C. Advances in copper complexes as anticancer agents / C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano // *Chemical reviews*. – 2014. – T. 114. – №. 1. – C. 815-862.
133. Marzano C. Copper complexes as anticancer agents / C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, C. Santini // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. – 2009. – T. 9. – №. 2. – C. 185-211.
134. Zhang Z. Novel copper complexes as potential proteasome inhibitors for cancer treatment / Z. Zhang, H. Wang, M. Yan, H. Wang, C. Zhang // *Molecular medicine reports*. – 2017. – T. 15. – №. 1. – C. 3-11.
135. Adsule S. Novel Schiff base copper complexes of quinoline-2 carboxaldehyde as proteasome inhibitors in human prostate cancer cells / S. Adsule, V. Barve, D. Chen, F. Ahmed, Q. P. Dou, S. Padhye, & F.H. Sarkar // *Journal of medicinal chemistry*. – 2006. – T. 49. – №. 24. – C. 7242-7246.
136. Daniel K. G. Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells / K. G. Daniel, P. Gupta,

- R. H. Harbach, W. C. Guida, Q. P. Dou // *Biochemical pharmacology*. – 2004. – T. 67. – №. 6. – C. 1139-1151.
137. Weissleder R. Molecular imaging in cancer / R. Weissleder // *Science*. – 2006. – T. 312. – №. 5777. – C. 1168-1171.
138. Lahoti H. S. Bioimaging: Evolution, Significance, and Deficit / H.S. Lahoti, S.D. Jogdand, H. Lahoti // *Cureus*. – 2022. – T. 14. – №. 9.
139. Gutfilen B. Copper-64: a real theranostic agent / B. Gutfilen, S.A.L. Souza, G. Valentini // *Drug design, development and therapy*. – 2018. – C. 3235-3245.
140. Ku G. Copper sulfide nanoparticles as a new class of photoacoustic contrast agent for deep tissue imaging at 1064 nm / G. Ku, M. Zhou, S. Song, Q. Huang, J. Hazle, C. Li // *ACS nano*. – 2012. – T. 6. – №. 8. – C. 7489-7496.
141. Louie A. Multimodality imaging probes: design and challenges / A. Louie // *Chemical reviews*. – 2010. – T. 110. – №. 5. – C. 3146-3195.
142. Fanizza E. NIR-Absorbing Mesoporous Silica-Coated Copper Sulphide Nanostructures for Light-to-Thermal Energy Conversion / E. Fanizza, R. Mastrogiacomo, O. Pugliese, A. Guglielmelli, L. De Sio, R. Castaldo, ... N. Depalo // *Nanomaterials*. – 2022. – T. 12. – №. 15. – C. 2545.
143. Goel S. Synthesis and biomedical applications of copper sulfide nanoparticles: from sensors to theranostics / S. Goel, F. Chen, W. Cai // *Small*. – 2014. – T. 10. – №. 4. – C. 631-645.
144. Mendel R. R. Cell biology of molybdenum / R.R. Mendel, F. Bittner // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. – 2006. – T. 1763. – №. 7. – C. 621-635.
145. Okamoto S. The biological occurrence and trafficking of cobalt / S. Okamoto, L. D. Eltis // *Metallomics*. – 2011. – T. 3. – №. 10. – C. 963-970.
146. Vasilichin V. A. Effects of metal oxide nanoparticles on toll-like receptor mRNAs in human monocytes / V. A. Vasilichin, S. A. Tsymbal, A. F. Fakhardo, E. I. Anastasova, A. S. Marchenko, A. A. Shtil, V. V. Vinogradov, E. I. Koshel // *Nanomaterials*. – 2020. – T. 10. – №. 1. – C. 127.

147. Tsymbal S. A. Recent advances in copper-based organic complexes and nanoparticles for tumor theranostics / S. Tsymbal, G. Li, N. Agadzhanian, Y. Sun, J. Zhang, M. Dukhinova, V. Fedorov, M. Shevtsov // *Molecules*. – 2022. – T. 27. – №. 20. – C. 7066.
148. Kuchur O. A., Tsymbal S. A. Metal-derived nanoparticles in tumor theranostics: Potential and limitations / O. A. Kuchur, S. A. Tsymbal, M. V. Shestovskaya, N. S. Serov, M. S. Dukhinova, & A. A. Shtil // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2020. – T. 209. – C. 111117.
149. Marczewska J. Influence of ascorbic acid on cytotoxic activity of copper and iron ions in vitro / J. Marczewska, J. H. Koziorowska, E. L. Anuszevska // *Acta Poloniae Pharmaceutica*. – 2000. – T. 57. – №. 6. – C. 415-418.
150. Guo H. Nickel carcinogenesis mechanism: DNA damage / H. Guo, H. Liu, H. Wu, H. Cui, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, Y. Li, X. Wang, L. Zhao // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – T. 20. – №. 19. – C. 4690.
151. Luczak M. W. Role of direct reactivity with metals in chemoprotection by N-acetylcysteine against chromium (VI), cadmium (II), and cobalt (II) / M.W. Luczak, A. Zhitkovich // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2013. – T. 65. – C. 262-269.
152. Alarifi S. Reactive oxygen species-mediated DNA damage and apoptosis in human skin epidermal cells after exposure to nickel nanoparticles / S. Alarifi, D. Ali, S. Alakhtani, E.S. Al Suhaibani, A.A. Al-Qahtani. // *Biological trace element research*. – 2014. – T. 157. – C. 84-93.
153. Xiong L. Yttrium chloride-induced cytotoxicity and DNA damage response via ROS generation and inhibition of Nrf2/PPAR γ pathways in H9c2 cardiomyocytes / L. Xiong, J. Huang, S. Wang, Q. Yuan, D. Yang, Z. Zheng, Y. Wu, C. Wu, Y. Gao, L. Zou, G. Hu // *Archives of Toxicology*. – 2022. – T. 96. – №. 3. – C. 767-781.
154. Ueda J. Reactive oxygen species generated from the reaction of copper (II) complexes with biological reductants cause DNA strand scission / J. I. Ueda, M.

- Takai, Y. Shimazu, T. Ozawa // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1998. – T. 357. – №. 2. – C. 231-239.
155. Oikawa S. N-acetylcysteine, a cancer chemopreventive agent, causes oxidative damage to cellular and isolated DNA / S. Oikawa, K. Yamada, N. Yamashita, S. Tada-Oikawa, S. Kawanishi // *Carcinogenesis*. – 1999. – T. 20. – №. 8. – C. 1485-1490.
156. Tsymbal S. A. Copper-containing nanoparticles and organic complexes: metal reduction triggers rapid cell death via oxidative burst / S. A. Tsymbal, A. A. Moiseeva, N. A. Agadzhanian, S. S. Efimova, A. A. Markova, D. A. Guk, O. O. Krasnovskaya, V. M. Alpatova, A. V. Zaitsev, A. V. Shibaeva, V. V. Tatarskiy, M. S. Dukhinova, V. A. Ol'shevskaya, O. S. Ostroumova, E. K. Beloglazkina, A. A. Shtil // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – T. 22. – №. 20. – C. 11065.
157. Li H. The combination of disulfiram and copper for cancer treatment / H. Li, J. Wang, C. Wu, L. Wang, Z. S. Chen, W. Cui // *Drug discovery today*. – 2020. – T. 25. – №. 6. – C. 1099-1108.
158. Özcelik D. N-acetylcysteine attenuates copper overload-induced oxidative injury in brain of rat / D. Özcelik, H. Uzun, M. Nazıroglu // *Biological trace element research*. – 2012. – T. 147. – C. 292-298.
159. Yang F. Copper induces oxidative stress and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in chicken hepatocytes / F. Yang, R. Pei, Z. Zhang, J. Liao, W. Yu, N. Qiao, Q. Han, Y. Li, L. Hu, J. Guo, J. Pan, & Z. Tang // *Toxicology in Vitro*. – 2019. – T. 54. – C. 310-316.
160. Rattan A. K., Arad Y. Temporal and kinetic determinants of the inhibition of LDL oxidation by N-acetylcysteine (NAC) / A.K. Rattan, Y. Arad // *Atherosclerosis*. – 1998. – T. 138. – №. 2. – C. 319-327.
161. Daniel K. G. Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells / K. G. Daniel, P. Gupta, R. H. Harbach, W. C. Guida, Q. P. Dou // *Biochemical pharmacology*. – 2004. – T. 67. – №. 6. – C. 1139-1151.

162. Finn N. A. Pro-oxidant and antioxidant effects of N-acetylcysteine regulate doxorubicin-induced NF-kappa B activity in leukemic cells / N.A. Finn, M.L. Kemp // *Molecular BioSystems*. – 2012. – T. 8. – №. 2. – C. 650-662.
163. Sagristá M. L. Antioxidant and pro-oxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation / M.L. Sagristá, A.F. García, M.A. De Madariaga, M. Mora // *Free radical research*. – 2002. – T. 36. – №. 3. – C. 329-340.
164. Putchala M. C. Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity—A systematic review / M. C. Putchala, P. Ramani, H. J. Sherlin, P. Premkumar, A. Natesan // *Archives of oral biology*. – 2013. – T. 58. – №. 6. – C. 563-574.
165. Ivanova I. P. Evaluation of prooxidant properties of ascorbic acid / I. P. Ivanova, S. V. Trofimova, I. M. Piskarev // *Biophysics*. – 2013. – T. 58. – C. 453-456.
166. Xu B. Disulfiram/copper selectively eradicates AML leukemia stem cells in vitro and in vivo by simultaneous induction of ROS-JNK and inhibition of NF- κ B and Nrf2 / B. Xu, S. Wang, R. Li, K. Chen, L. He, M. Deng, V. Kannappan, J. Zha, H. Dong, W. Wang // *Cell death & disease*. – 2017. – T. 8. – №. 5. – C. e2797-e2797.
167. Du C. Disulfiram/copper induces antitumor activity against gastric cancer cells in vitro and in vivo by inhibiting S6K1 and c-Myc / C. Du, X. Guan, Y. Liu, Z. Xu, X. Du, B. Li, M. Wang, Z. Zheng // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2022. – T. 89. – №. 4. – C. 451-458.
168. Kannappan V. Recent advances in repurposing disulfiram and disulfiram derivatives as copper-dependent anticancer agents / V. Kannappan, M. Ali, B. Small, G. Rajendran, S. Elzhenni, H. Taj, W. Wang, Q.P. Dou // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2021. – T. 8. – C. 741316.