

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Уральский федеральный университет имени
первого Президента России Б. Н. Ельцина»
Химико-технологический институт
Научно-образовательный и инновационный центр химико-фармацевтических технологий

На правах рукописи



Тохтуева Мария Дмитриевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ
ЦИКЛОПЛАТИНИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ОЦЕНКА ИХ РОЛИ В
ЗАПУСКЕ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В
ЗЛОКАЧЕСТВЕННО ПЕРЕРОЖДЕННЫХ КЛЕТКАХ**

1.4.16 – Медицинская химия

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук, доцент
Мелехин Всеволод Викторович

Екатеринбург – 2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. Аналитический обзор литературы	10
1.1. Введение.....	10
1.2. Существующие препараты платины	11
1.2.1. Одобренные и применяющиеся препараты платины	12
1.2.2. Препараты на стадиях клинических испытаний, перспективы и разработки	15
1.2.3. Проблемы возникновения резистентности.....	17
1.2.3.1. Детоксикация, опосредуемая системой GSH/NRF2.....	17
1.2.3.2. Репарация повреждённой ДНК по NER-механизму	18
1.2.3.3. Усиление выведения препаратов	19
1.2.3.4. Блокада апоптоза	19
1.2.4. Выводы по разделу.....	20
1.3. Способы преодоления резистентности через индукцию альтернативных механизмов клеточной гибели с помощью комплексов платины	20
1.3.1. Апоптоз	21
1.3.2. Ферроптоз	24
1.3.3. Некроптоз.....	26
1.3.4. Аутофагия	28
1.3.5. Паратоз.....	31
1.3.6. Другие типы клеточной смерти	33
1.3.7. Выводы по разделу.....	33
1.4. Заключение	34
Глава 2. Обсуждение результатов	36
2.1. Объекты исследования – комплексы платины(II).....	36
2.1.1. Биологическое тестирование соединений платины (II).....	37
2.1.1.1. Проверка растворимости	37
2.1.1.2. Изучение цитотоксичности <i>in vitro</i>	37
2.1.1.3. Взаимосвязь «структура-активность» (SAR).....	44
2.1.2. Определение общего противоопухолевого механизма действия соединения-лидера ...	46
2.1.2.1. Индукция апоптоза.....	47
2.1.2.2. Влияние на активность репликации ДНК и клеточного деления.....	50
2.1.2.3. Индукция окислительного стресса	53

2.1.3. Идентификация мишени и характеристика неапоптотического механизма клеточной гибели	55
2.1.3.1. Изучение механизма индуцируемой клеточной гибели по типу ферроптоза	55
2.1.3.2. Подтверждение мишени	60
2.1.4. Изучение эффектов, опосредованных ферроптозом и блокировкой глутатиона	65
2.1.4.1. Эффекты, ассоциированные с ферроптозом	66
2.1.4.1.1. Перекисное окисление липидов	66
2.1.4.2. Сопутствующие изменения	68
2.1.4.2.1. Молекулярные эффекты, вызванные веществом	68
2.1.4.2.2. Морфологические изменения	69
2.1.4.2.3. Влияние на потенциал ($\Delta\Psi_m$) внутренней митохондриальной мембраны (ВММ)	70
2.1.4.3. Выводы по эффектам, связанным с индукцией ферроптоза и блокировкой глутатиона	73
2.1.4.4. Модуляция эффектов соединения антиоксидантом	73
2.1.5. Выводы по комплексам платины (II)	77
2.2. Синтез потенциального пролекарства – комплекса платины (IV)	78
2.2.1. Изучение цитотоксичности платины (IV) <i>in vitro</i>	80
2.2.2. Подтверждение мишени и механизма действия комплекса платины (IV)	82
2.2.2.1. Антиоксидантная система NRF2/GSH	82
2.2.2.2. Реакция с глутатионом	86
2.2.3. Вовлечение апоптоза и дополнительные мишени	89
2.2.4. Выводы по комплексу платины(IV)	92
Глава 3. Экспериментальная часть	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
СПИСОК ИСТОЧНИКОВ	125
СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	137

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Актуальность темы исследования обусловлена проблемой распространённости онкологических заболеваний и статистикой летальных исходов. В 2024 году общий показатель первичной заболеваемости злокачественными опухолями в России достиг 477,6 случая на 100 тысяч человек. Этот уровень оказался на 3,6 % выше, чем годом ранее, и на 23,1 % превысил значения 2014 года. Всего за этот год впервые в жизни онкологические заболевания были диагностированы у 698693 россиян: у 322198 мужчин и 376495 женщин. Рост данного показателя относительно 2023 года составил 3,6 % [1]. Эта динамика подчёркивает, что неоплазии остаются одной из наиболее значимых проблем здравоохранения, создавая серьёзный вызов для общества и экономики как в мире в целом, так и в России, где злокачественные новообразования (ЗНО) занимают второе место среди причин смертности населения.

Среди основных подходов к борьбе с онкологическими заболеваниями важное место занимают лекарственные препараты на основе платины – например, цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин. Они являются стандартом при лечении многих типов злокачественных опухолей. Однако, даже при подтверждённой эффективности в клинике, их использование ограничено двумя серьёзными факторами: опухолевые клетки часто приобретают устойчивость к таким препаратам, а также высок риск тяжёлых нежелательных реакций. В итоге страдает как результат терапии, так и качество жизни пациентов. Следовательно, поиск способов преодоления лекарственной устойчивости и уменьшения токсичности платиновых соединений – это важная и актуальная научная и практическая задача.

Возникновение резистентности и токсичности напрямую связано с доминирующим апоптотическим механизмом действия платиновых лекарств и других вариантов химиотерапии. В связи с этим, перспективной стратегией является поиск соединений, индуцирующих альтернативные, неапоптотические пути гибели клеток.

Одним из перспективных подходов к преодолению описанных выше ограничений является создание новых соединений платины, принципиально отличающихся по структуре от применяемых в настоящее время цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина. Сохранение в их составе иона платины позволяет рассчитывать на удержание уже доказанной противоопухолевой активности, характерной для данного класса препаратов. В то же время модификация лигандного окружения, геометрии комплекса или общей архитектуры молекулы способна изменить механизм цитотоксического действия и/или спектр поражаемых мишеней в опухолевой клетке. Это, в свою очередь, открывает возможности для обхода существующих путей резистентности и снижения побочных эффектов за счёт более селективного накопления или активации в ЗНО.

В настоящее время в литературе описаны отдельные комплексы платины(II), структурно отличающиеся от цисплатина и способные индуцировать альтернативные механизмы гибели опухолевых клеток. Однако все имеющиеся данные получены исключительно в экспериментах *in vitro* и не вышли за пределы доклинических исследований, но сам факт существования таких соединений подтверждает принципиальную возможность реализации альтернативных механизмов действия в рамках координационной химии платины(II).

Большими перспективами в контексте преодоления резистентности обладают комплексы платины(IV), которые представляют собой пролекарства, восстанавливающиеся до активных форм платины(II) внутри клетки. Для таких соединений также продемонстрирована активность *in vitro*, в том числе способность запускать альтернативные пути индукции клеточной смерти.

Несмотря на широкое изучение противоопухолевых свойств соединений платины разной валентности, на стадию клинических испытаний вышли исключительно комплексы платины(IV). При этом важно отметить, что те пролекарства Pt(IV), которые в настоящее время проходят клинические испытания, реализуют механизм действия, аналогичный таковому у традиционных препаратов платины, и, следовательно, не позволяют в полной мере решить проблему приобретённой резистентности.

В этой связи актуальным представляется изучение комплексов платины(II) как потенциальных индукторов неапоптотических путей клеточной гибели. В случае подтверждения того, что такие комплексы реализуют требуемый механизм действия (отличный от ДНК-повреждающего), целесообразен дальнейший дизайн соответствующих пролекарств на основе платины(IV), которые будут высвобождать активные формы Pt(II) внутри опухолевой клетки. Такой подход позволяет сочетать структурное разнообразие Pt(II)-комплексов с фармакокинетическими преимуществами Pt(IV)-пролекарств.

Цель работы

Цель данной работы – изучить противоопухолевые свойства серии комплексов платины(II) арилбипиридинов, определить механизм индукции клеточной смерти для соединения-лидера и разработать на его основе потенциальное пролекарство в виде комплекса платины(IV) с верификацией мишени.

Для достижения цели были определены следующие задачи:

1. Первичный скрининг цитотоксической активности серии комплексов платины(II) *in vitro* и определение соединения-лидера;
2. Установление основного противоопухолевого механизма действия. Оценка вклада апоптоза, блокировки репликации ДНК и окислительного стресса, в том числе в сравнении с существующими препаратами платины, на примере цисплатина;

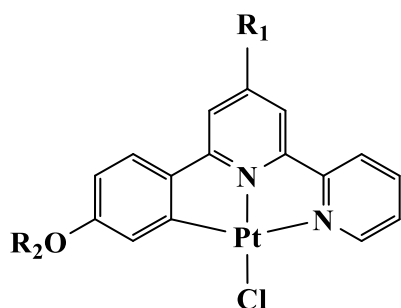
3. Идентификация мишени и характеристика механизма клеточной гибели соединения-лидера, изучение эффектов, вызванных индукцией определенного в исследовании механизма действия комплекса платины(II);

4. Исследование цитотоксической активности разработанного потенциального пролекарства – комплекса платины(IV);

5. Определение механизма действия и мишени разработанного комплекса платины(IV).

Объекты исследования

Объектами настоящего исследования являются хлорплатиновые(II) комплексы арилбипиридинов.



$R_1=H, R_2=H$ (a); $R_1=H, R_2=CH_3$ (b); $R_1=H, R_2=C_2H_5$ (c);
 $R_1=H, R_2=iso-C_5H_{11}$ (d); $R_1=H, R_2=iso-C_8H_{17}$ (e);
 $R_1=Ph, R_2=H$ (f); $R_1=Ph, R_2=CH_3$ (g); $R_1=Ph, R_2=iso-C_8H_{17}$ (h)

Научная новизна и теоретическая значимость работы

Научная новизна работы заключается в том, что впервые предложен и обоснован подход использования комплексов платины(II) как индукторов ферроптотических механизмов клеточной гибели с последующей трансформацией наиболее перспективного соединения в пролекарство на основе платины(IV). В отличие от известных стратегий, ориентированных на модификацию классического ДНК-повреждающего действия, в данной работе акцент сделан на структурно обусловленную переориентацию механизма активности. Новизна также состоит в том, что в качестве исходной матрицы для создания Pt(IV)-пролекарств выступают не стандартные клинические аналоги (цисплатин, карбоплатин), а предварительно отобранные Pt(II)-комплексы с доказанной способностью индуцировать альтернативные пути гибели злокачественных клеток. Теоретическая значимость работы определяется расширением современных представлений о взаимосвязи «структура соединения платины – механизм цитотоксического действия».

Практическая значимость работы

Практическая значимость состоит в создании научного фундамента для разработки потенциальных противоопухолевых препаратов нового поколения, лишенных ключевых недостатков существующих лекарств на основе платины – высокой системной токсичности и приобретенной резистентности.

Методология и методы научного исследования

Методология данного исследования заключается в комплексном подходе, объединяющем методы исследования активности химических соединений, начиная от первичного скрининга, заканчивая идентификацией внутриклеточной мишени, и синтез нового вещества с подтверждением структуры с применением необходимого набора инструментальных подходов. Исходные комплексы платины(II) были синтезированы согласно описанным методикам, которые были воспроизведены с необходимой точностью.

Положения, выносимые на защиту

1. Из серии выбранных хлорплатиновых(II) комплексов арилбипиридинов одно соединение обладает выраженной противоопухолевой активностью против клеток ЗНО и является веществом-лидером;
2. Определен основной противоопухолевый механизм соединения-лидера, связанный с окислительным стрессом и не обусловленный образованием сшивок с ДНК в отличие от классических препаратов платины, индуцирующих апоптоз;
3. Установлена внутриклеточная мишень хлорплатинат(II) 6-(4-(2-этилгексил)оксифенил)-2,2'-бипиридина – глутатион и антиоксидантная система NRF2/GSH, блокировка которой приводит к запуску ферроптоза, одного из вариантов программируемой неапоптотической гибели клеток;
4. На основе соединения-лидера Pt(II) разработано потенциальное пролекарство – комплекс Pt(IV), цитотоксическая активность которого значительно превышает предшественник;
5. Определен механизм действия комплекса платины (IV), включающий индукцию ферроптоза и блокировку глутатионовой системы. Идентифицированы дополнительные мишени, вызывающие также апоптотические механизмы клеточной гибели.

Достоверность полученных результатов обеспечена применением современных методов исследования и воспроизводимостью:

1. Использовались паспортизированные клеточные линии, входящие в коллекцию ATCC;
2. Применяемые методы выполнялись согласно протоколам, описанным в научных статьях или инструкциях производителей;

3. Все эксперименты проводились в нескольких независимых повторях и обрабатывались с применением статистических методов анализа, что подтверждает релевантность полученных данных;

4. Анализ структур, полученных соединений, осуществлялся на поверенном оборудовании УрФУ.

Апробация результатов

Основные результаты работы представлены на 12 международных и всероссийских конференциях, среди которых VI Международная научно-практическая конференция молодых учёных и студентов, посвященная году науки и технологий «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (Екатеринбург, 2021 г.), VII международная научно-практическая конференция молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (Екатеринбург, 2022 г.), XII Ежегодная межвузовская межрегиональная научная конференция «Актуальные вопросы развития Российской фармации» – «Ильинские чтения» (Санкт-Петербург, 2022 г.), I Междисциплинарная всероссийская молодежная научная школа-конференция с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты» (Казань, 2023 г.), IX Международная научно-практическая конференция молодых учёных и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (Екатеринбург, 2024 г.), 27-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (Пущино, 2024 г.), IX Молодежная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2024 г.), Международная научная конференция «Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ» (Москва, 2025 г.), Международная научная конференция «Актуальные вопросы биотехнологии» (Екатеринбург, 2025).

Публикации

Основное содержание диссертационного исследования изложено в 3 статьях в журналах, индексируемых библиографическими базами Scopus и/или включенных в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ; 12 тезисах докладов на конференциях всероссийского и международного уровней.

Благодарность

Автор выражает глубокую и искреннюю благодарность коллективу лаборатории первичного биоскрининга, клеточных и генных технологий НОиИЦ ХФТ ХТИ УрФУ, в частности научному руководителю к.м.н., доценту В.В. Мелехину за неоценимую помощь в проведении исследований и подготовке работы, инженерам-исследователям А.В. Парамоновой и Е.И. Андреевой; заведующему лабораторией Комплексных исследований и экспертной оценки

органических материалов ЦКП УрФУ, к.х.н., доценту О.С. Ельцову и аспиранту кафедры ТОС ХТИ УрФУ, инженеру лаборатории Комплексных исследований и экспертной оценки органических материалов ЦКП УрФУ В.М. Абрамову за проведение экспериментов ЯМР, постановку синтеза и отработку методик получения изучаемых соединений, а также д.х.н. Д.Н. Кожевникову, к.х.н. В.Н. Кожевникову и к.х.н. А.Ф. Сулеймановой, без первоначальных исследований которых эта работа могла не состояться.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 23-23-00375.

Глава 1. Аналитический обзор литературы

1.1. Введение

Злокачественные новообразования (ЗНО) остаются одной из наиболее острых и социально значимых проблем современного глобального здравоохранения. Согласно последним данным Международного агентства по изучению онкологических патологий (IARC), в 2022 году во всем мире было зарегистрировано около 20 миллионов новых случаев заболевания и почти 10 миллионов летальных исходов, при этом прогнозируется рост данных показателей к 2050 году более чем на 70 %. Несмотря на успехи в ранней диагностике и стандартизации терапии, онкологическая патология занимает второе место среди причин смертности в развитых странах после сердечно-сосудистых заболеваний, уступая лишь по частоте, но не по медико-экономическому ущербу, связанному с длительной потерей трудоспособности и инвалидизацией пациентов молодого и среднего возраста [2].

Современная онкология располагает широким спектром противоопухолевых методов, включая хирургическое вмешательство, лучевую терапию, таргетную терапию, иммунотерапию и гормонотерапию [3]. Однако системная химиотерапия по-прежнему остаётся одним из наиболее распространённых подходов при многих видах злокачественных новообразований [4]. Тем не менее возможности химиотерапии далеко не всегда позволяют достичь устойчивой ремиссии или полного излечения. Ключевыми ограничениями данного подхода являются выраженная системная токсичность, приводящая к тяжёлым побочным эффектам (миелосупрессия, кардио- и нейротоксичность) [5–7], а также феномен приобретённой или первичной резистентности опухолевых клеток к воздействию [8, 9]. Всё это обуславливает острую необходимость поиска принципиально новых противоопухолевых молекул с селективным механизмом действия, а также разработки альтернативных терапевтических стратегий, которые позволили бы изменить сложившуюся ситуацию.

Особое место среди цитостатических средств, используемых при лечении пациентов с ЗНО, занимают платиносодержащие препараты (цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин) [10]. Исторически открытие противоопухолевой активности цисплатина в 1960-х годах [11] стало прорывом, и по сей день производные платины входят в стандарты первой линии терапии широкого спектра солидных опухолей, включая рак яичников, лёгкого, толстой кишки, головы и шеи, а также герминогенные новообразования [10]. Столь широкое применение обусловлено уникальным механизмом действия: образованием внутри- и межнитевых сшивок ДНК, что приводит к необратимому ингибированию репликации и транскрипции, запуску апоптоза в быстро делящихся опухолевых клетках [12–18]. Известны также второстепенные противоопухолевые механизмы цисплатина, такие как повреждение митохондрий [19],

окислительный стресс [20], стресс эндоплазматического ретикулума [21, 22], изменение механизмов клеточного транспорта [23], взаимодействие с белками «цинковыми пальцами» [24], нарушение цитоскелета [21] и взаимодействие с РНК [25, 26]. Но всё в это, в конечном итоге, приводит к активации механизмов апоптоза. Апоптоз – самый известный и наиболее изученный тип программируемой клеточной смерти [27], он запускается при возникновении нарушений в процессе жизнедеятельности нормальной клетки, например, при непоправимых повреждениях ДНК, клеточном стрессе и пр. и позволяет нормально функционировать организму, своевременно уничтожая поврежденные клетки без вреда для организма. Апоптоз представляет собой генетически запрограммированный, упорядоченный механизм клеточной гибели, реализующийся в виде каскада последовательных биохимических реакций в ответ на стрессовые воздействия или сигналы микроокружения [28]. В опухолевых клетках механизмы запуска апоптоза нарушены, из-за чего они неограниченно делятся, метастазируют и приобретают новые генотипические и фенотипические признаки [29]. Вследствие этого, нацеливание на механизмы апоптоза и эффективное уничтожение неопластических клеток по этому пути является одним из самых распространенных способов создания новых противоопухолевых агентов [30]. Основным существенным недостатком лекарственных средств, вызывающих гибель опухолевых клеток через апоптоз, является быстрая выработка неоплазиями устойчивости к терапии и поддержание бессмертия через обходные сигнальные пути [31]. И, несмотря на свой клинический успех, платиновые соединения, индуцирующие апоптоз, также во многих случаях оказываются неэффективны. Устойчивость к цисплатину, например, включает в себя механизмы, ограничивающие образование аддуктов ДНК или действующие после взаимодействия цисплатина с ДНК и способствующие тем самым выживанию клеток [32]. Резистентность является не единственным фактором, лимитирующим клиническую эффективность платиновой терапии. Она также сопровождается сильными побочными эффектами, такими как нефротоксичность, нейротоксичность и отоксичность [33]. Поэтому, учитывая доказанную высокую эффективность существующих платиносодержащих препаратов, но при этом и их существенные недостатки (выраженная системная токсичность и развитие резистентности), в настоящее время ведётся активный поиск и создание новых соединений платины, способных повысить противоопухолевую активность химиотерапии при более благоприятном профиле безопасности.

1.2. Существующие препараты платины

В данном разделе рассмотрены основные представители класса (цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин), преимущества их клинического применения, спектр активности, а также

фундаментальные проблемы – системная токсичность и формирование лекарственной резистентности:

1. Платиноиды, как правило, действуют неселективно, поражая не только быстро пролиферирующие опухолевые клетки, но и здоровые ткани с высоким митотическим индексом (костный мозг, эпителий желудочно-кишечного тракта, волосяные фолликулы). Это приводит к развитию тяжелых побочных эффектов, ограничивающих возможность достижения терапевтически эффективных доз и существенно снижающих качество жизни пациентов.

2. Параллельно с проблемой токсичности нарастает частота возникновения лекарственной резистентности. Опухолевые клетки адаптируются к длительному воздействию химиопрепаратов за счет активации различных механизмов, которые будут рассмотрены ниже [32, 33].

Эти аспекты служат отправной точкой для поиска новых стратегий противоопухолевой терапии.

1.2.1. Одобренные и применяющиеся препараты платины

В настоящее время управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрены три препарата платины для системной противоопухолевой терапии: цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин (рис. 1.1., табл.1.1). Более того, эти соединения также зарегистрированы и одобрены большинством других крупных регуляторных органов по всему миру, в том числе в Российской Федерации, что делает их общепризнанным глобальным стандартом платиносодержащей химиотерапии [10, 34].

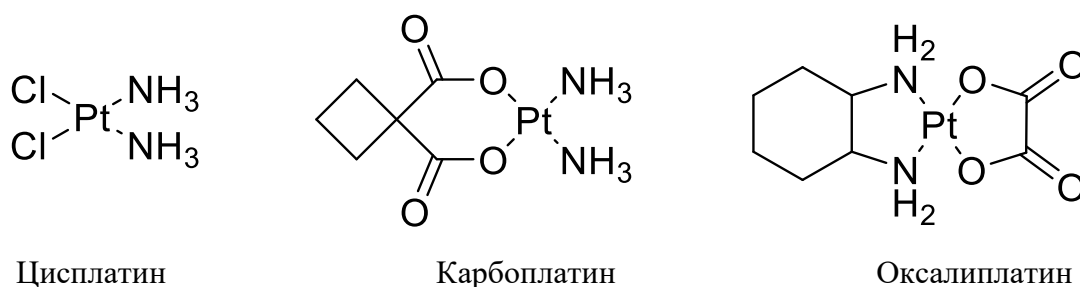


Рисунок 1.1 – Структурные формулы одобренных в мировой медицинской практике препаратов платины

В таблице 1.1. представлены ключевые параметры цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина, включая их механизмы действия, клинические показания и профили токсичности.

Таблица 1.1 – Сравнительная характеристика препаратов платины, одобренных к применению в мире [10, 34, 35]

Параметр	Цисплатин	Карбоплатин	Оксалиплатин
Год одобрения FDA	1978	1989	1994
Поколение	I поколение	II поколение	III поколение
Механизм действия	Образование внутри- и межнитевых сшивок ДНК → ингибирование репликации и транскрипции → запуск апоптоза	Аналогичен цисплатину (образование сшивок ДНК), но более стабилен в плазме крови благодаря циклобутандикарбоксилатному лиганду	Платина формирует объёмные аддукты с ДНК, эффективно блокирующие репликацию.
Связывание с белками плазмы	~90–95%	Низкое	~90%
Основные показания	Рак яичек, яичников, мочевого пузыря, головы/шеи, лёгкого, шейки матки	Рак яичников, мелкоклеточный рак лёгкого	Метастатический колоректальный рак (в комбинации с 5-FU/LV)
Дозолимитирующая токсичность	Нефротоксичность	Миелосупрессия (тромбоцитопения, нейтропения)	Нейротоксичность (периферическая сенсорная)
Нефротоксичность	+++	+	±
Ототоксичность	+++	+	±
Нейротоксичность	++ (периферическая нейропатия)	+	+++ (холодовая гиперчувствительность, парестезии)
Миелосупрессия	+	+++ (тромбоцитопения)	+

Условные обозначения: «+» – низкая степень выраженности, «++» – умеренная, «+++» – высокая; «±» – встречается редко или выражена минимально

Помимо трёх глобально одобренных препаратов платины, в отдельных странах Азии для клинического применения зарегистрированы ещё три соединения этого класса. Недаплатин (Япония, 1995 г.) – препарат II поколения, обладающий механизмом действия, аналогичным цисплатину, но с лучшей водорастворимостью и меньшей нефро-, ото- и нейротоксичностью; его дозолимитирующей токсичностью является миелосупрессия (тромбоцитопения, нейтропения), а основные показания включают немелкоклеточный и мелкоклеточный рак лёгкого, рак пищевода, головы и шеи, мочевого пузыря и яичников. Лобаплатин (Китай, 2010 г.) содержит 1,2-диаминометилциклобутановый лиганд, активен при хроническом миелолейкозе, метастатическом раке молочной железы и мелкоклеточном раке лёгкого; его дозолимитирующим побочным эффектом является тромбоцитопения, а нефро- и нейротоксичность выражены слабее, чем у цисплатина. Гептаплатин (Южная Корея, 1999 г.) разработан с целью снижения системной токсичности и применяется преимущественно при раке желудка; его дозолимитирующей токсичностью выступают нефротоксичность и внутрибрюшное кровотечение. Все три препарата не одобрены FDA и не входят в международные клинические рекомендации первой линии [36]. Строение вышеописанных соединений представлено на рис. 2.1.

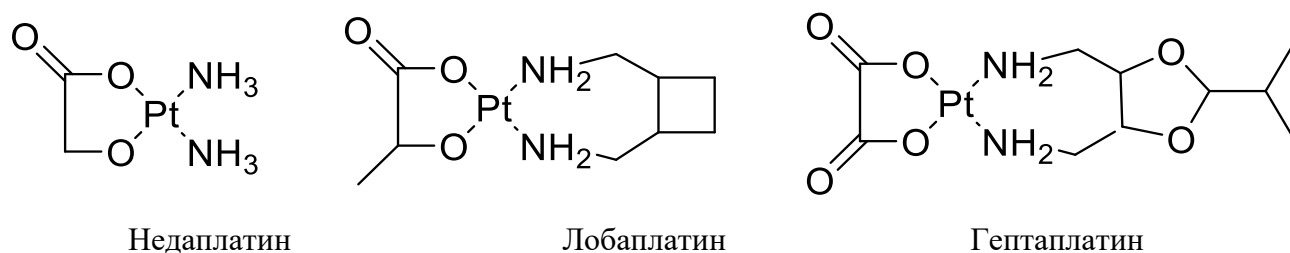


Рисунок 1.2 – Структурные формулы одобренных в некоторых странах препаратов платины

Общей проблемой для всех вышеописанных соединений является часто приобретаемая устойчивость неопластических клеток к их воздействию. К основным механизмам резистентности относятся – цитозольная детоксикация, повышенная способность к репарации ДНК, снижение накопления препарата, нарушение механизмов апоптоза и регуляции клеточного цикла. Все механизмы резистентности дополняют друг друга, способствуя минимизации количества препарата, связанного с ядерной ДНК [37–39]. Первая линия защиты клеток – ограничение количества молекул препарата в клетке за счет снижения их поступления или усиления выведения. Молекулы, проникшие в клетку, могут быть инактивированы путем необратимой ковалентной модификации клеточными нуклеофилами. Принято считать, что основным внутриклеточным фактором, нацеливающимся на цисплатин, является глутатион (GSH). Предположение о том, что GSH инактивирует цисплатин путем ковалентного связывания с ним, основано прежде всего на том наблюдении, что во многих случаях уровни GSH в

резистентных к цисплатину клеточных линиях повышены по сравнению с чувствительными клетками, и на способности GSH реагировать с цисплатином в водном растворе [40]. Есть данные, подтверждающие, что цисплатин является мишенью для нацеливания внутриклеточного глутатиона, образующего бинарный комплекс $[Pt(SG)_2]$ [41]. Кроме того, молекулы платины, которые достигают ядерной ДНК и связываются с ней, могут быть обнаружены и удалены системой эксцизионной репарации ДНК, которая очень эффективна в резистентных клеточных линиях.

Именно эти недостатки платиновых цитостатиков – их токсичность и приобретённая резистентность – стимулируют поиск новых молекул, нацеленных на неапоптотические механизмы гибели опухолевых клеток.

1.2.2. Препараты на стадиях клинических испытаний, перспективы и разработки

В настоящее время нет комплексов платины (II), находящихся на стадиях клинических испытаний, описаны только комплексы платины (IV), что, вероятно, связано с тем, что ключевым направлением преодоления недостатков классических платиновых цитостатиков (Pt(II)) является разработка пролекарства с октаэдрической структурой, к которым и относятся комплексы платины (IV). В отличие от Pt(II), соединения Pt(IV) обладают более высокой стабильностью в кровотоке, возможностью перорального применения, сниженной системной токсичностью за счёт селективной активации внутри опухолевых клеток, а также дополнительными позициями для присоединения терапевтических или таргетных лигандов [42, 43].

Ключевые преимущества Pt(IV) комплексов:

- Контролируемая активация и снижение системной токсичности;
- Возможность перорального применения;
- Расширенные возможности структурной модификации;
- Преодоление лекарственной резистентности [42, 43].

На сегодняшний день несколько соединений Pt(IV) достигли стадий клинических испытаний (от I до III фазы), однако ни одно из них пока не получило одобрения FDA или других крупных регуляторных органов. К числу наиболее изученных относятся ормаплатин (тетраплатин), ипроплатин (JM9), сатраплатин (JM216) и LA-12 – рис. 1.3 [36]. Анализ результатов их клинических испытаний представляет особый интерес, поскольку позволяет выявить критические ограничения, которые необходимо преодолеть при разработке новых соединений Pt(IV).

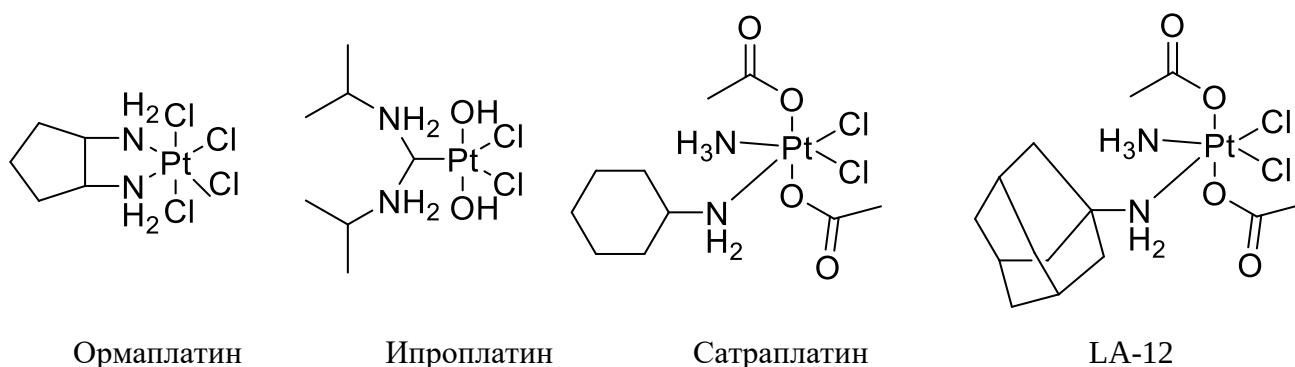


Рисунок 1.3 – Структурные формулы комплексов платины (IV), проходящих стадии клинических испытаний

Ормаплатин (тетраплатин) стал первым комплексом Pt(IV), достигшим клинических испытаний (I фаза). Препарат вводился внутривенно. Однако его исследование было остановлено по двум причинам: во-первых, препарат демонстрировал чрезмерно быстрое восстановление до Pt(II) уже в плазме крови, что нивелировало преимущество селективной активации внутри опухоли; во-вторых, это приводило к развитию тяжёлой нейротоксичности, сопоставимой с цисплатином, но без улучшения терапевтического индекса [44, 45].

Ипроплатин (JM9) – достиг III фазы клинических испытаний и вводился внутривенно. Несмотря на успешное доклиническое изучение, в клинике препарат показал низкую эффективность, недостаточную для достижения значимого противоопухолевого эффекта [46].

Сатраплатин (JM216) – наиболее изученный комплекс Pt(IV), достигший III фазы клинических испытаний. Его главным достижением стала демонстрация возможности перорального применения платиновых препаратов – значительное преимущество перед внутривенными цитостатиками Pt(II). Сатраплатин изучался при раке яичников, немелкоклеточном и мелкоклеточном раке лёгкого. Однако, несмотря на улучшение выживаемости без прогрессирования (ВБП) в некоторых исследованиях, препарат не показал преимущества по общей выживаемости (ОВ) пациентов по сравнению со стандартными режимами терапии. Именно отсутствие значимого увеличения ОВ стало причиной того, что заявка на регистрацию сатраплатина была отозвана, и препарат не получил одобрения FDA [18, 46, 47].

LA-12 (OC-6-43-бис(ацетато)(1-адамантиламин)амминдихлороплатина (IV)) – ещё один пероральный комплекс Pt(IV), который достиг I фазы клинических испытаний (продолжающихся в настоящее время). Между тем, полученных промежуточных данных о завершённых этапах клинических исследований LA-12 недостаточно для окончательных выводов о его эффективности и безопасности [48].

Известно, что по сравнению с препаратами платины (II), эти комплексы обладают меньшей реакционной способностью, что снижает потерю активного вещества, продлевает стабильность препарата в кровотоке и уменьшает частоту нежелательных побочных реакций [46]. Важно отметить, что разработка тетраплатина, ипроплатина и сатраплатина, была прекращена на различных фазах клинических испытаний из-за высокой токсичности и недостаточной эффективности, тогда как LA-12 остается многообещающим кандидатом, на которого по-прежнему возлагаются надежды. Важно отметить, что основным механизмом индукции клеточной гибели для всех комплексов платины(IV), включая прошедшие клинические испытания, остается образование сшивок в ДНК, которые блокируют репликацию и транскрипцию, не поддаются эффективной репарации и в конечном итоге запускают апоптоз [46, 49].

Резистентность к платиновым препаратам развивается через хорошо описанные механизмы: снижение внутриклеточного накопления, инактивацию тиоловыми соединениями, гиперэкспрессию систем репарации и дерегуляцию апоптотических каскадов [37–41]. Клинически это проявляется отсутствием ответа на терапию при рецидивах и необходимостью использования высокотоксичных доз. В этой связи актуальным является не просто синтез новых платиновых производных, а поиск соединений, способных индуцировать гибель клеток через альтернативные сигнальные пути, не связанные напрямую с повреждением ядерной ДНК, или эффективно действующих в условиях активной репарации генома. Однако эффективный дизайн таких соединений невозможен без понимания механизмов, лежащих в основе устойчивости опухолевых клеток к препаратам платины. Ниже представлен анализ основных путей формирования этой устойчивости.

1.2.3. Проблемы возникновения резистентности

К числу центральных механизмов резистентности опухолевых клеток к платиновым цитостатикам относятся детоксикация, опосредуемая системой глутатиона (GSH) и фактором транскрипции NRF2; репарация повреждённой ДНК по механизму эксцизионной репарации нуклеотидов (NER); нарушение внутриклеточной кинетики платины, связанное с изменением транспорта (снижение активности импортёра CTR1 и гиперактивация экспортёров семейства ATP7); а также блокада апоптоза через дисрегуляцию ключевых сигнальных путей.

1.2.3.1. Детоксикация, опосредуемая системой GSH/NRF2

Уровень клеточных тиолов, таких как глутатион, играет решающую роль в детоксикации препаратов на основе платины. GSH может связывать и инактивировать цисплатин через свою реакционноспособную тиоловую группу, предотвращая связывание цисплатина с ДНК и ее повреждение [50]. Было показано, что снижение уровня глутатиона с помощью его ингибиторов

усиливает выработку активных форм кислорода под действием препаратов платины, что приводит к усилению гибели клеток, а воздействие на NRF2, как с помощью фармакологических препаратов, так и путем генетического нокдауна, повышает чувствительность неопластических клеток к гибели, вызванной платиновыми лекарствами [51]. Интересно отметить, что ингибитор глутатиона бутиронилсульфимид (BSO) повышает чувствительность клеток глиомы к темозоломиду (алкилирующий агент из класса имидазотетразинов [52]) как в монотерапии, так и в сочетании с цисплатином. Более того, в модели *in vivo* комбинация BSO, цисплатина и темозоломида активировала апоптотические механизмы, включая эффекторные каспазы 3 и 7 [53, 54]. Это говорит об участии глутатиона в формировании резистентности не только в случае использования препаратов платины, но и других схем лечения.

Экспрессия ферментов, участвующих в синтезе GSH, регулируется фактором транскрипции NRF2, ключевым регулятором антиоксидантного ответа. Активность NRF2 регулируется келч-подобным ECH-ассоциированным белком 1 (KEAP1). При активации NRF2 диссоциирует от KEAP1 и перемещается в ядро, где он активирует транскрипцию ряда генов антиоксидантов, таких как гены глутатион-S-трансферазы. Мутации в генах *KEAP1* и *NRF2* связаны с низкой выживаемостью пациентов онкологического профиля. Высокая экспрессия NRF2 коррелирует с химиорезистентностью при некоторых видах злокачественных опухолей, поскольку она помогает клеткам преодолевать окислительный стресс, вызванный терапией [51]. Более того, показано, что NRF2 обеспечивает множественную лекарственную устойчивость (МЛУ), так как, помимо активации транскрипции генов антиоксидантов, он является регулятором экспрессии белков-переносчиков лекарств, предотвращающих накопление препаратов в клетках и подавляет апоптотическую гибель за счет прямого контроля экспрессии антиапоптотических факторов (*BCL2*) [55].

Таким образом, нацеливание на GSH/NRF2 систему является перспективной терапевтической стратегией для повышения чувствительности клеток к химиопрепаратам, в том числе – платиновым.

1.2.3.2. Репарация повреждённой ДНК по NER-механизму

NER – это система восстановления (репарации) ДНК, которая устраняет повреждения, связанные с нарушением спиральной структуры. Репарация происходит в четыре этапа: (а) распознавание повреждения ДНК, (б) декомпактизация хроматина, (в) рестрикция ДНК выше и ниже повреждения с помощью эндонуклеаз и (г) ресинтез и лигирование ДНК [56]. Белки NER могут распознавать повреждения ДНК, вызванные препаратами платины, и устранять их из генома, тем самым нейтрализуя цитотоксичность и повышая устойчивость к препаратам [57].

1.2.3.3. Усиление выведения препаратов

Резистентность к платине может быть связана с усилением выведения препаратов из клеток или из ядра в цитоплазму. В выведении платины и развитии резистентности к ней участвуют аденозинтрифосфатазы Р-типа, транспортирующие медь: АТР7А и АТР7В. Считается, что АТР7А регулирует накопление платины, в основном за счет внутриклеточного связывания с ней, в то время как АТР7В, расположенная в аппарате Гольджи, обеспечивает выведение платины посредством процесса, включающего ее перемещения в везикулы, участвующие в секреторном пути [39, 58]. СТР1 – основной белок, обеспечивающий приток меди в клетки человека. Было отмечено, что клетки с мутацией СТР1, снижающей экспрессию этого белка, обладают более высокой устойчивостью к цисплатину [58]. После воздействия цисплатина транспортеры меди быстро интернализуются в цитоплазме, что снижает экспрессию транспортеров на поверхности клеток и ограничивает дальнейшее поглощение цисплатина [39].

Важную роль в устойчивости к цисплатину играет также MRP2 – одна из семи известных изоформ белка, ассоциированного с множественной лекарственной устойчивостью (MRP), которая обеспечивает усиленное выведение цисплатина. Повышенный уровень этого белка-переносчика наблюдался в резистентных клетках. Кроме того, снижение уровня MRP2 с помощью антисмысловых олигонуклеотидов повышало чувствительность к цисплатину, что подтверждает участие MRP2 в формировании резистентности [59].

1.2.3.4. Блокада апоптоза

Одним из механизмов МЛУ является подавление апоптоза. Было показано, что апоптоз – важный фактор чувствительности опухоли к химиопрепаратам. Сообщалось об изменениях в генах *TP53*, *CDKN1A*, *BCL2* и в путях передачи сигналов, приводящих к апоптозу в клетках, устойчивых к лекарственным препаратам. Установлено, что повышенная экспрессия антиапоптотических белков и снижение активности каспазы-3 связаны с резистентностью [60].

Известно, что цисплатин способствует активации белка р53, супрессора опухолевого роста, после распознавания повреждений ДНК. Платинат преимущественно активирует киназу АТР, которая фосфорилирует белок р53 по серину-15, что приводит к его активации. Из всех сигналов митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), участвующих в токсических эффектах, вызываемых цисплатином, включая внеклеточные сигнальные киназы (ERK), N-концевые киназы JNK, киназы сигнального пути МАРК, наиболее важной представляется активация ERK, поскольку активированная ERK также фосфорилирует белок р53 по серину-15. Важную роль в передаче сигнала о повреждении ДНК в апоптотические пути играет белок HER2. Это трансмембранный рецептор с тирозинкиназным внутриклеточным доменом, который имеет сходство с рецептором эпидермального фактора роста. Активация HER2 распространяет

нисходящую передачу сигналов через фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K/AKT). Агонисты рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR), в том числе различные цитокины, ангиотензин II и эндотелин-1, вызывают трансактивацию EGFR и HER2. PI3K/AKT, активируемый HER-2, вызывает цитоплазматическую локализацию ингибитора циклин-зависимых киназ (CDKN1A). Снижение ядерного уровня CDKN1A устраняет p53-зависимые антипролиферативные эффекты, вызываемые цисплатином, и, следовательно, поддерживает устойчивость к цисплатину [59].

1.2.4. Выводы по разделу

Таким образом, фенотип платинорезистентной клетки не ограничивается дефектами апоптотического каскада. Как показано выше, устойчивость может быть обусловлена снижением внутриклеточной аккумуляции препарата (вследствие нарушения функции импортёров CTR1 или активации экспортных транспортёров ATP7A/B), усилением детоксикации (опосредованной глутатион-S-трансферазами или NRF2), а также повышением активности систем репарации ДНК, в частности компонентов NER-пути. В такой ситуации классическая стратегия, направленная на индукцию апоптоза, оказывается малоперспективной в виду множественных блоков на пути реализации этой программы. Принципиально иной подход заключается в запуске альтернативных программ клеточной гибели, функционирование которых не зависит от перечисленных нарушенных систем. Речь идёт о неапоптотических механизмах, включая ферроптоз [61], некроптоз [62], аутофагическую гибель или пироптоз [63] и др. Далее будут проанализированы экспериментальные стратегии активации этих путей, а также оценена актуальность использования данного подхода.

1.3. Способы преодоления резистентности через индукцию альтернативных механизмов клеточной гибели с помощью комплексов платины

Как уже было описано выше, индукция неапоптотической гибели клеток в злокачественных опухолях является многообещающей стратегией преодоления устойчивости к традиционным методам лечения [64, 65], которые, в первую очередь, нацелены на апоптоз. В настоящее время, помимо апоптоза известны также некроптоз [62, 66], пироптоз [67], аутофагия, ферроптоз, партанатоз, нетоз [63], онкоз [68] и другие виды клеточной смерти. Исследование этих неапоптотических путей открывает новые возможности для разработки эффективных стратегий противоопухолевой терапии и одной из высокоперспективных платформ в разработке противоопухолевых агентов являются соединения платины.

Для корректного понимания альтернативных форм клеточной смерти первоочередным образом следует рассмотреть апоптоз – основной тип запрограммированной гибели, индуцируемый химиотерапевтическими препаратами, включая производные платины, и именно его нарушения чаще всего лежат в основе приобретенной резистентности.

1.3.1. Апоптоз

Сигнальная фаза апоптоза может быть реализована посредством двух путей: внешнего (рецепторного) и внутреннего (митохондриального):

1. Внешний (рецепторный) механизм индукции апоптоза активируется при взаимодействии рецепторов смерти со специфическими лигандами, например, при гипоксии, действии повреждающих физических или химических факторов, сбоях в регуляции клеточного цикла и аналогичных сигналах. Рецепторы, отвечающие за этот путь, принадлежат к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR). К ним относятся FASR (известный также как CD95 или APO-1), TNFR1 (p55, CD120A), а также CAR1, DR3, DR4 и DR5. Все эти рецепторы являются трансмембранными белками: их внеклеточная часть распознает соответствующий лиганд (например, FASL для FASR или фактор некроза опухолей (TNF) для TNFR1), а цитоплазматический домен содержит домен смерти (DD) – специфический участок из 80 аминокислот. В передаче сигнала задействованы характерные внутриклеточные адаптеры; для FAS-подобных рецепторов адаптером служит белок FADD (FAS-ассоциированный белок с доменом смерти), связывающийся с DD. Процесс запускается при соединении лиганда с внеклеточным доменом, что приводит к активации рецептора и изменению формы его внутриклеточного домена, позволяя адаптеру связаться с эффекторами – неактивными прокаспазами. В итоге собираются мультибелковые сигнальные комплексы, индуцирующий гибель (DISC), которые также называют апоптосомами. Внутри DISC происходит аутокаталитическая активация иницирующих каспаз 2, 8 и 10, которые затем активируют каспазу-3 и -7 – ключевые эффекторные каспазы [69].

2. Внутренний (митохондриальный) путь передачи апоптотического сигнала запускается при повреждении ДНК или действии цитотоксических агентов, что приводит к активации белка p53. Ключевым следствием активации p53 является изменение активности белков семейства BCL2, которые выступают главными регуляторами проницаемости наружной мембраны митохондрий (MOMP). При развитии апоптоза по митохондриальному пути MOMP возрастает, и из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль высвобождаются растворимые белки-участники апоптоза: цитохром c, прокаспазы 2, 3, 9, а также фактор, индуцирующий апоптоз (AIF). Далее, подобно каскаду реакций при внешнем пути передачи сигнала, с участием цитохрома C формируется апоптосома, внутри которой происходит активация инициаторной каспазы-9. Активная каспаза-9 взаимодействует с эффекторной прокаспазой-3 и -7, активирует их, и запускается каспазный каскад, реализующий дальнейшие реакции эффекторной фазы апоптоза. Белок AIF выступает основным эффектором альтернативного пути апоптоза и индуцирует апоптотические реакции независимо от каспаз, поэтому данный путь также называют каспаз-независимым [69].

Общим для обоих путей является то, что каждый из них предполагает стадию активации, инициирующей каспазы, за которой следует активация эффекторных каспаз. И внешний, и внутренний путь апоптоза в конечном счете приводят к фрагментации ДНК и клеточного ядра, формированию апоптотических телец и их последующему быстрому фагоцитозу (рис 1.4) [69].

Молекулярный механизм апоптоза, вызванного цисплатином, включает активацию белка p53, фосфорилирование компонента активаторного белка (AP1), что приводит к остановке клеточного цикла за счет стимуляции CDKN1A и снижения уровня циклинов и циклинзависимых киназ. Исследования показали, что цисплатин вызывает гибель клеток посредством механизмов, опосредованных активацией митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) и/или N-концевой киназы JNK. Это предполагает активацию внутреннего пути апоптоза за счет изменения мембранного потенциала митохондрий, высвобождения цитохрома C и повышения активности каспазы-3 [70]. Однако было показано, что цисплатин может эффективно преодолевать блокаду митохондриального апоптоза за счет активации внешнего рецепторного пути апоптоза в некоторых модельных клеточных линиях [71]. Таким образом, устойчивость к апоптозу после введения цисплатина может наблюдаться только в том случае, если заблокированы как внешние, так и внутренние пути.

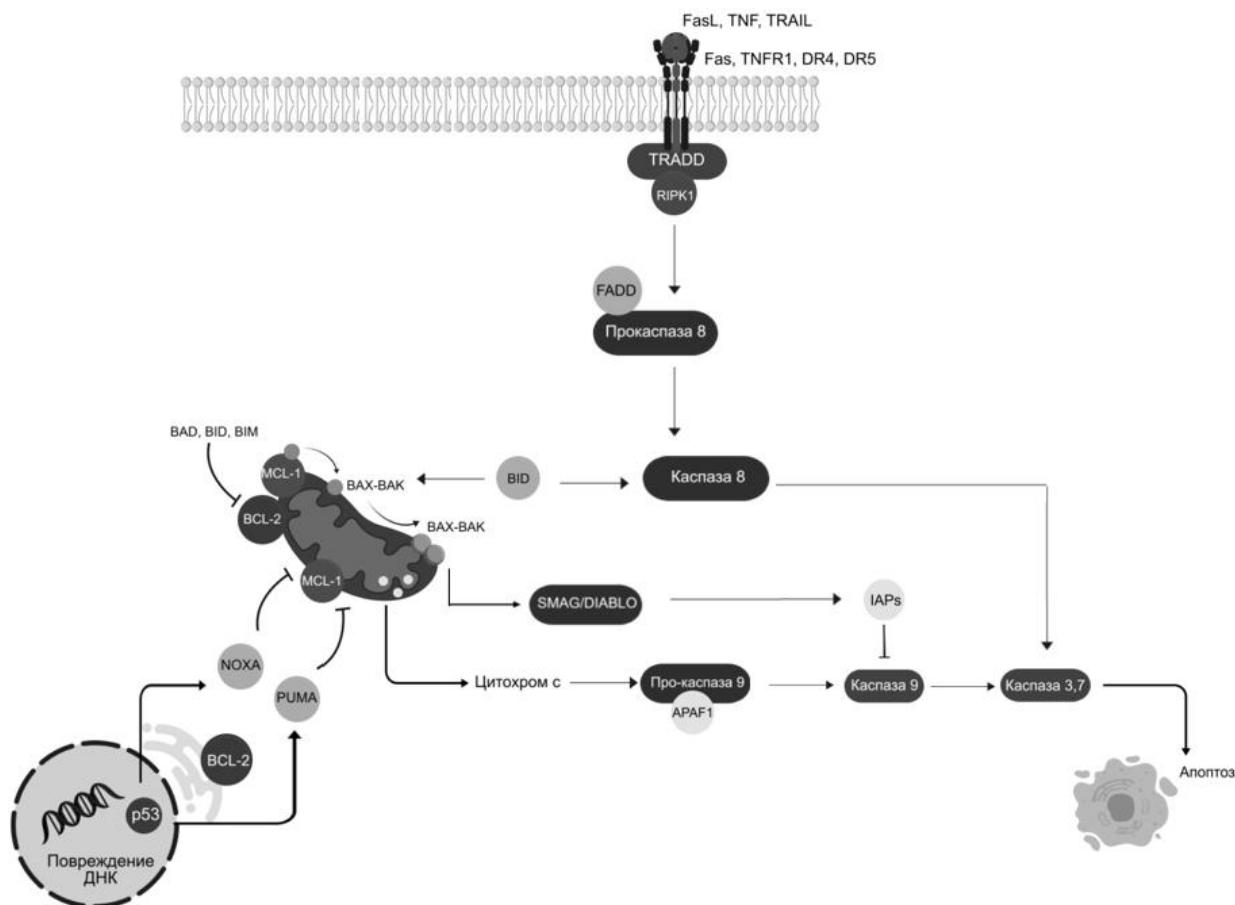


Рисунок 1.4 – Внешний (рецепторный) путь апоптоза опосредуется активацией локализованных в плазматической мембране рецепторов смерти (таких как TNFR1 – рецептор фактора некроза опухоли 1, FASR и TRAIL-рецепторы DR4 и DR5) их специфическими лигандами (соответственно, TNF – фактором некроза опухоли, FASL – лигандом FASR и TRAIL – TNF-связанным лигандом, индуцирующим апоптоз). Внутренний (митохондриальный) путь апоптоза может активироваться, например, при повреждении митохондрий или ДНК. Активация белков семейства BCL2 (например, транскрипционная индукция NOXA и PUMA под действием p53, посттрансляционная модификация BAD и BIM, а также расщепление BID каспазой-8) индуцирует повреждение митохондрий двумя способами: инактивацией антиапоптотических членов семейства BCL2 (таких как BCL2, BCL-xL и MCL-1); активацией олигомеризации членов семейства BCL2 – BAX и BAK. Повреждение митохондрий приводит к высвобождению цитохрома С и SMAC (второго митохондриального активатора каспаз, также известного как DIABLO) в цитозоль, что способствует активации каспазы-9, опосредованной апоптотическим протеазо-активирующим фактором 1 (APAF1). Активированная каспаза-9, в свою очередь, расщепляет и активирует нижестоящие каспазу-3 и каспазу-7, которые непосредственно осуществляют апоптоз [72]

1.3.2. Ферроптоз

Индукция ферроптоза потенциально может помочь преодолеть апоптотическую резистентность, поскольку этот путь гибели функционально не зависит от каспаз, p53 и белков семейства BCL2 – ключевых регуляторов апоптоза, которые часто нарушены в резистентных клетках. Ферроптоз опирается на иные молекулярные мишени: глутатионпероксидазу GPX4, систему антиоксидантной защиты (GSH, SLC7A11), метаболизм железа (ферритин, TFR) и митохондриальный редокс-гомеостаз (DHODH, MMP).

Запуск ферроптоза связан с нарушением метаболизма железа, которое индуцирует гибель клетки двумя путями: генерацией активных форм кислорода (АФК) через реакцию Фентона и активацией железосодержащих липоксигеназ (LOX). Результатом обоих механизмов становится перекисное окисление липидов.

Железо существует в двух формах: трёхвалентное (Fe^{3+}) и двухвалентное (Fe^{2+}). Оно поступает в клетку через рецептор трансферрина 1 (TFR1), восстанавливается до Fe^{2+} ферриредуктазой (STEAP3) и высвобождается в цитоплазму с помощью переносчика DMT1 (SLC11A2). Избыток Fe^{2+} запасается в ферритине (комплекс из лёгкой цепи FTL и тяжёлой цепи FTH1), который окисляет Fe^{2+} до нетоксичного Fe^{3+} . Выведение железа осуществляется ферропортином (SLC11A3). При сбое этой системы избыток Fe^{2+} генерирует гидроксил-радикалы по реакции Фентона.

Образовавшиеся радикалы проникают в мембраны, отнимают атом водорода от жирных кислот и запускают цепное перекисное окисление липидов, повреждая мембраны. Альтернативно, пероксиды липидов (LOOH) образуются ферментативно – под действием LOX, а также цитохрома P450 с его редуктазой (POR), которая генерирует H_2O_2 , что в присутствии Fe^{2+} также приводит к образованию радикалов (рис. 1.5) [73].

Важно отметить, что при ферроптозе происходит подавление антиоксидантной защиты, которое связано с нарушением трёх основных систем: глутамат-цистеинлигазной (GSH), убихинон-связывающего белка (CoQ10) и кофермента тетрагидробиоптерина (BH4). Классический путь ферроптоза опосредован осью $\text{Xc}^-/\text{GSH}/\text{GPX4}$: система Xc^- (цистеин-глутаматный антипортер SLC7A11) транспортирует цистеин для синтеза GSH, который служит субстратом для селенсодержащего фермента глутатионпероксидазы 4 (GPX4), снижающего уровень липидных гидроперекисей. GPX4-независимая защита обеспечивается белком FSP1 (AIFM2), который восстанавливает убихинон (CoQ10) до убихинола (CoQH2) NADPH-зависимым образом, предотвращая перекисное окисление липидов, а также путём GCH1/BH4, где тетрагидробиоптерин (BH4) в паре с дигидробиоптерин (BH2) образует окислительно-восстановительный цикл, нейтрализующий радикалы и защищающий мембраны [73].

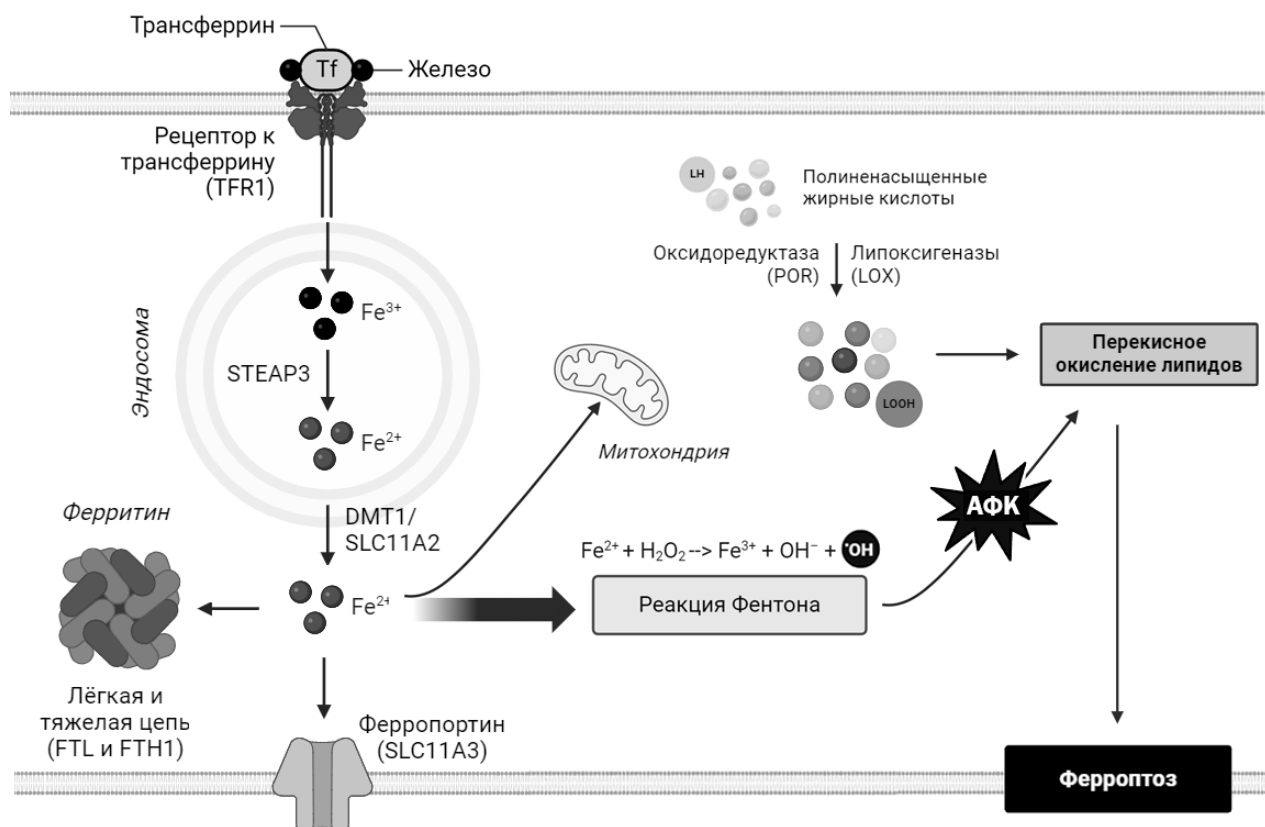


Рисунок 1.5 – Механизм ферроптоза включает в себя следующие ключевые события: (1) дисбаланс метаболизма железа, приводящий к накоплению Fe²⁺; (2) реакцию Фентона (Fe²⁺ + H₂O₂), генерирующую гидроксильные радикалы; (3) перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот, инициируемое гидроксильными радикалами; (4) образование реактивных альдегидов (4-гидроксиноненал), формирующих аддукты с биомолекулами; (5) истощение пула глутатиона (GSH) вследствие ингибирования цистин-глутаматного антипортера xCT; (6) инактивацию глутатионпероксидазы 4 (GPX4), которая в норме восстанавливает липидные гидропероксиды; (7) подавление альтернативных антиоксидантных систем (например, FSP1/CoQ); и (8) массивное накопление липидных гидропероксидов в мембранах, что приводит к нарушению их целостности и гибели клетки [73]

Недавно был синтезирован новый ферроптоз-индуцирующий оксалиплатин-артесунат на основе артесуната, индуцирующего ферроптоз, и оксалиплатина **1.1** (рис. 1.6). Он индуцировал ферроптоз через два параллельных механизма: (1) подавление антиоксидантной защиты (истощение GSH, снижение GPX4 и SLC7A11) и (2) накопление лабильного железа (расщепление ферритина, повышение TFR, усиление реакции Фентона). Дополнительно комплекс нарушал митохондриальный гомеостаз, что приводило к массовой утечке АФК и катализу перекисного окисления липидов. *In vivo* комплекс продемонстрировал выраженную противоопухолевую активность с регрессией опухоли [74].

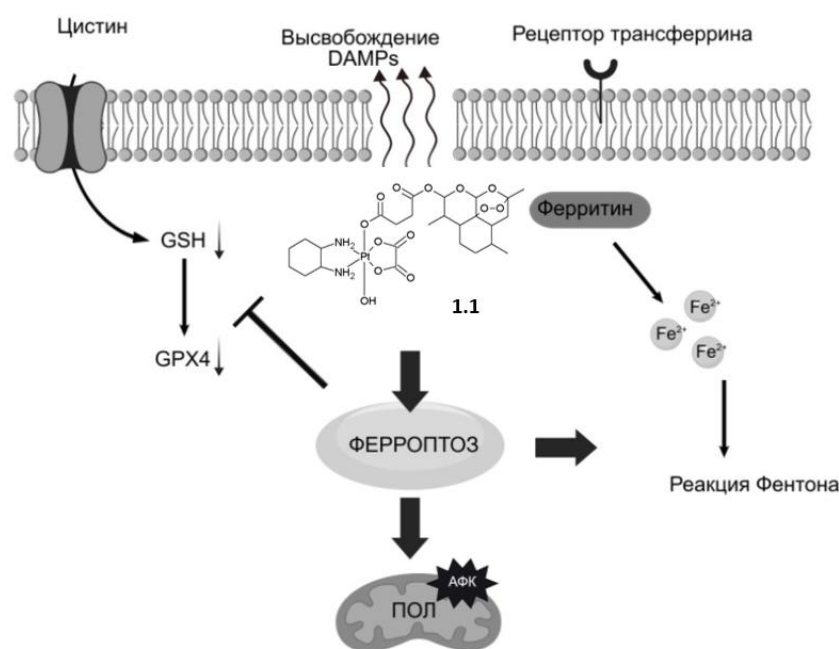


Рисунок 1.6 – Индукция ферроптоза с помощью комплекса платины (оксалиплатин-артесунат) и его строение

1.3.3. Некроптоз

Некроптоз – программируемая некротическая гибель клеток, не зависящая от каспаз. Ключевые регуляторы: взаимодействующая с рецептором протеинкиназа 1 и 3 (RIPK1, RIPK3) и псевдокиназа, подобная киназам смешанного типа (MLKL). Некроптоз включает в себя следующие этапы:

1. Инициация и формирование комплексов. Связывание $\text{TNF}\alpha$ с TNFR1 приводит к рекрутированию белков: RIPK1, смертельный домен, ассоциированный с TNFR (TRADD), клеточный белок-ингибитор апоптоза 1/2 (сIAP1/2), фактор 2/5, ассоциированный с TNFR (TRAF2/5). Формируется комплекс I, в котором полиубиквитинированный RIPK1 активирует ядерный фактор каппа В (NF- κ B) и выживание клетки.

2. Переключение на гибель. Деубиквитинирование RIPK1 ферментом деубиквитиназой, ассоциированной с цилиндроматозом (CYLD) ограничивает NF- κ B и приводит к образованию цитоплазматического комплекса II (рипоптосома) из RIPK1, TRADD, FADD и прокаспазы-8.

3. Выбор пути: апоптоз или некроптоз. В комплексе II активная каспаза-8 расщепляет RIPK1 и RIPK3, запуская апоптоз. При ингибировании каспазы-8 расщепления не происходит и реализуется некроптоз.

4. Формирование некросомы и эффекторная фаза. Активированный RIPK1 (фосфорилирование по S161 – серину в положении 161) взаимодействует с RIPK3 через мотив гомотипического взаимодействия RIP (RHIM-домены), формируя некросому.

5. RIPK3 фосфорилирует MLKL, который олигомеризуется и транслоцируется к плазматической мембране, вызывая её пермеабиллизацию и гибель клетки с высвобождением ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов (DAMPs), запускающих воспаление (рис. 1.7) [75].

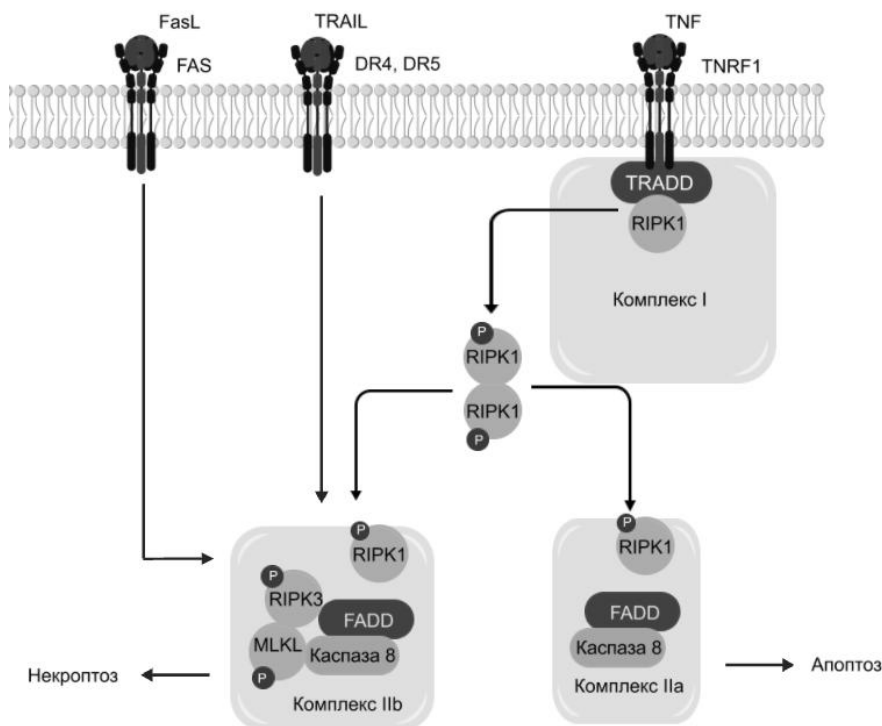


Рисунок 1.7 – При активации TNF цитоплазматический DD тримеризованного TNFR1 формирует комплекс I, который рекрутирует адаптер TRADD, киназу RIPK1, E3 убиквитинлигазы (TRAF2, cIAP1/2, LUBAC, A20, CYLD/SPATA2) и убиквитин-связывающие белки (NEMO, ABIN1, OPTN). В комплексе I RIPK1 полиубиквитинируется (Lys63- и Met1-связи), что активирует комплексы TAK1, TBK1 и IKK. При неактивной RIPK1 фосфорилирование и деградация IκB активируют ядерный NF-κB. Дерегуляция комплекса I активирует RIPK1, что ведёт к формированию двух альтернативных комплексов: IIa и IIb. Комплекс IIa включает FADD, каспазу-8 и RIPK1, активирует каспазу-8, которая активирует каспазу-3, инициирующую апоптоз. При ингибировании каспазы-8 RIPK1 связывается с RIPK3 (комплекс IIb), RIPK3 фосфорилирует MLKL, в результате чего происходит разрушение мембраны и запускается некроптоз. Активация DR4/DR5 (TRAIL), FASR (FASL) также может индуцировать некроптоз [72]

Был синтезирован терпиридиновый комплекс платины(II) **1.2** (рис. 1.8), который нековалентно связывался с ДНК и индуцировал гибель опухолевых клеток преимущественно в результате некроптоза. В культурах, обработанных данным веществом, не наблюдалось изменений в экспрессии *BAX* и расщепления прокаспазы-3. Однако во внеклеточной среде был обнаружен HMGB1 (компонент хроматина, необходимый для выживания клеток, который при апоптозе прочно с ним связан), что свидетельствует о некротическом типе смерти. Соединение вызывало остановку клеточного цикла в G1 фазе, увеличение уровней белков p53 и p21 [76].

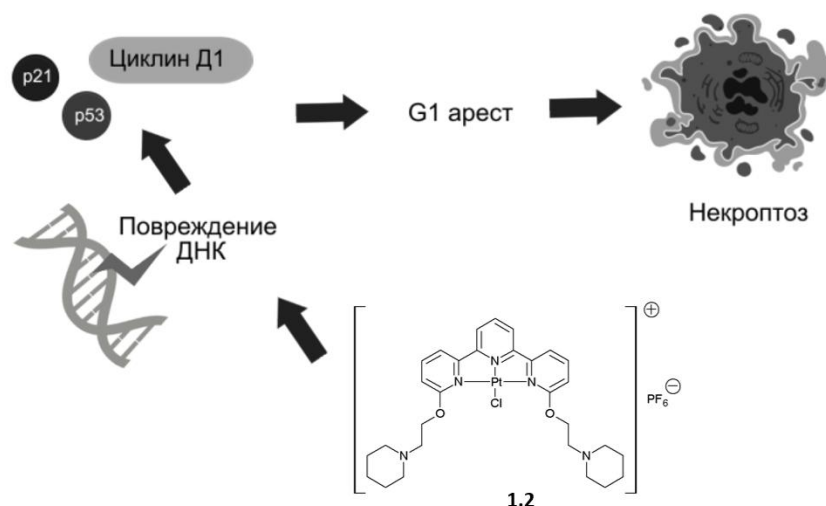


Рисунок 1.8 – Индукция некроптоза с помощью терпиридинового комплекса платины(II) и его строение

1.3.4. Аутофагия

Аутофагия – это процесс, при котором клеточные компоненты или целые органеллы доставляются в лизосомы для гидролитического расщепления. Она стимулируется при недостатке аденозинтрифосфата (АТФ) и питательных веществ, а также при сигналах от повреждённых органелл [77].

Индукция аутофагии представляет собой двоякую стратегию преодоления апоптотической резистентности, поскольку в зависимости от контекста этот путь может как способствовать выживанию клетки, так и приводить к её гибели. В платинорезистентных опухолевых клетках часто наблюдается повышенный базальный уровень аутофагии, который выполняет цитопротекторную функцию, помогая клеткам выживать после повреждения ДНК, индуцированного препаратами платины. В связи с этим ингибирование аутофагии (например, хлорохином или 3-метиладенином) сенситизирует резистентные клетки к цисплатину, переключая тип гибели на апоптоз [78]. Однако при определённых условиях чрезмерная или продолжительная аутофагия может сама по себе индуцировать аутофагическую клеточную

смерть, которая не зависит от каспаз и способна элиминировать апоптоз-резистентные опухолевые клетки [78–81].

Ключевые этапы аутофагии включают в себя:

1. Инициация: комплекс, состоящий из киназы, активирующей аутофагию, подобной Унс-51 (ULK1); белков, связанных с аутофагией (ATG13); взаимодействующего белка семейства киназы фокальных адгезий массой 200 кДа (FIP200) и белка, ассоциированного с аутофагией 101 (ATG101), транслоцируется к сайтам инициации.

2. Нуклеация и образование фагофора: комплекс ULK1 регулирует привлечение комплекса белка сортировки вакуолярных белков 34 (VPS34). VPS34 включает фосфатидилинозитол-3-киназу I класса III (PI3K); VPS34; белок 14, связанный с аутофагией, подобный (ATG14L), белок сортировки вакуолярных белков 15 (VPS15) и ключевой белок регулятор аутофагии (Beclin 1). Этот комплекс обеспечивает образование фосфатидилинозитол-3-фосфата (PIP3) в месте формирования фагофора (зародыша аутофагосомы). PIP3 служит сигналом для связывания других белков.

3. Элонгация и замыкание: фагофор увеличивается благодаря двум убиквитин-подобным конъюгирующим каскадам: ATG5-ATG12 и MAP-LC3/ATG8/LC3. По мере удлинения фагофор поглощает часть цитоплазмы и замыкается, образуя двумембранную аутофагосому.

4. Созревание и деградация: аутофагосома сливается с лизосомой, формируя аутолизосому. Содержимое деградирует, а образующиеся макромолекулы высвобождаются в цитозоль для повторного использования (рис. 1.9).

Центральный регулятор аутофагии – киназа, мишень рапамицина млекопитающих (mTOR). Подавление её активности стимулирует образование комплекса ULK1 и активирует аутофагию [77].

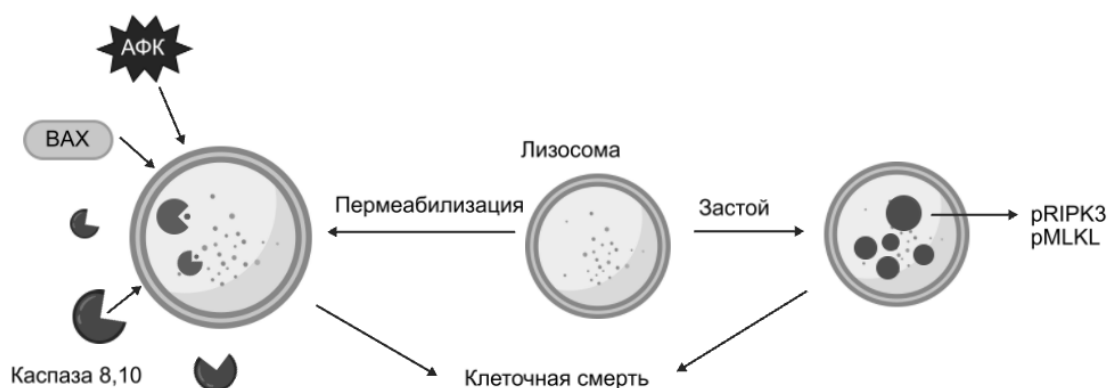


Рисунок 1.9 – Аутофагия. Пермеабилзация лизосомальной мембраны (слева) может индуцироваться активными формами кислорода (ROS), лизосомотропными соединениями, а также активированными белком ВАХ и каспазами. Этот процесс приводит к высвобождению катепсинов и других гидролитических ферментов из просвета лизосом в цитозоль.

Лизосомальный застой (справа) возникает вследствие накопления различных веществ: глюкозилцерамида и глюкозилсфингозина, а также липофусцина. В свою очередь, лизосомальный застой способен приводить к активации киназы RIPK3 и псевдокиназы MLKL. pMLKL – фосфорилированная форма MLKL; pRIPK3 – фосфорилированная форма RIPK3 [72]

Было показано, что монофункциональный комплекс платины(II) **1.3** (моно-Pt (N-(трет-бутоксикарбонил)-l-метионин-N'-8-хинолиламидхлороплатина(II)) индуцирует аутофагическую гибель клеток карциномы яичников человека.

По сравнению с цисплатином, он практически не вызывал остановки клеточного цикла и повреждения ДНК и приводил к неапоптотической гибели клеток (рис. 1.10). Гибель клеток, вызванная данным соединением, имела следующие признаки: цитоплазматическая вакуолизация, независимость от каспаз, отсутствие фрагментации ядра или конденсации хроматина, отсутствие апоптотических телец. Гибель клеток, вызванная моноплатиной, значительно замедлялась при подавлении экспрессии *ATG7*, а также при использовании ингибиторов аутофагии [79].

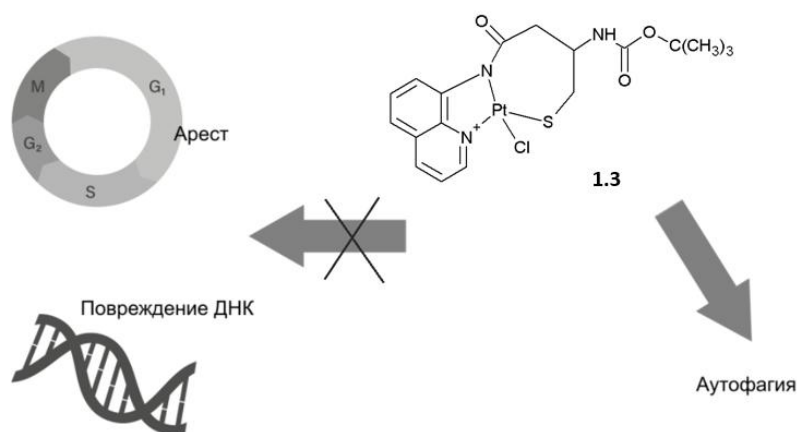


Рисунок 1.10 – Индукция аутофагии посредством монофункционального комплекса платины(II) и его структура

Другие исследования выявили комплексы платины(II) **1.4** и **1.5** с 8-замещенными производными хинолина в качестве лигандов, которые локализуются в митохондриях, где они могут индуцировать как апоптоз, так и аутофагическую гибель клеток. Эти комплексы стимулировали стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и высвобождали АФК, что приводило к значительным цитотоксическим эффектам (рис. 1.11) [80, 81]. Также, были описаны комплексы платины(IV) индуцирующие аутофагию [82, 83].

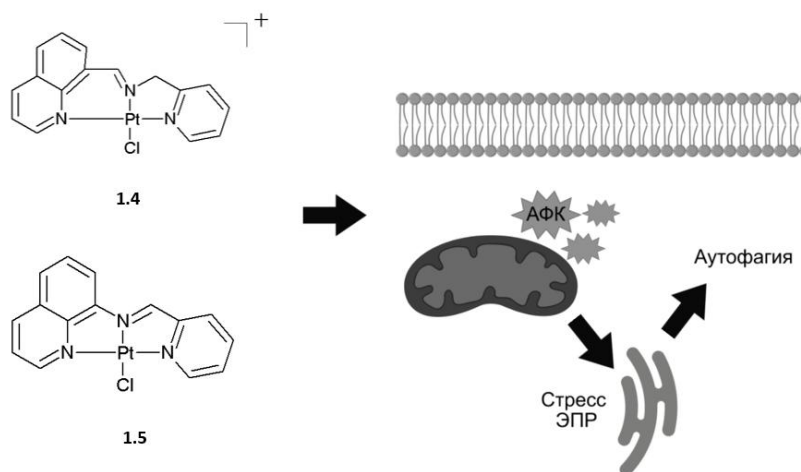


Рисунок 1.11 – Индукция аутофагии посредством комплексов платины(II) и их строение

1.3.5. Параптоз

Параптоз – это неклассическая форма регулируемой клеточной гибели, которая морфологически характеризуется набуханием эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и/или митохондрий, а также образованием цитоплазматических вакуолей. Основные триггеры и механизмы:

1. Снижение деградации белков (протеостаз): нарушение работы убиквитин-протеасомной системы (например, ингибиторами протеасом) приводит к накоплению поврежденных или неправильно свернутых белков, вызывая стресс ЭПР.

2. Нарушение тиол-редокс гомеостаза: воздействие на тиоловые группы белков (например, ингибирование тиоредоксинредуктазы 1) нарушает их фолдинг и функцию, способствуя протеотоксическому стрессу.

3. Перегрузка митохондрий ионами кальция (Ca^{2+}): избыточный поток Ca^{2+} из ЭПР в митохондрии (по ЭПР-митохондриальной оси) приводит к дисфункции и набуханию митохондрий.

4. Повышенная генерация АФК: окислительный стресс, вызванный АФК, является как причиной, так и следствием нарушений в ЭПР и митохондриях, усугубляя повреждение.

5. Ключевые сигнальные пути: важную роль в индукции параптоза играет гиперактивация сигнальных путей митоген-активируемых протеиназ (МАРК) и JNK [84].

Таргетирование параптоза открывает новые возможности для элиминации апоптоз-резистентных опухолевых клеток через обход классических каспазных каскадов и использование альтернативных сигнальных путей, ассоциированных со стрессом ЭПР и МАРК-активацией. Так, был описан гетеробиметаллический платиновый (II)-ферроценовый комплекс вместе с платинированием ядерной ДНК и мт-ДНК **1.6** (рис. 1.12), который индуцирует образование активных форм кислорода, вызывает серьезное повреждение митохондрий, приводящее к истощению мембранного потенциала и общему снижению митохондриального дыхания со значительным уменьшением как базального, так и максимального уровня кислородного потребления, а также выработки АТФ. Кроме того, он расширяет ЭПР и вызывает его стресс, нарушая гомеостаз Ca^{2+} . Многостороннее воздействие на клетки приводит к некроптозу и параптозу, которые не зависят от сигнального каскада апоптоза [85].

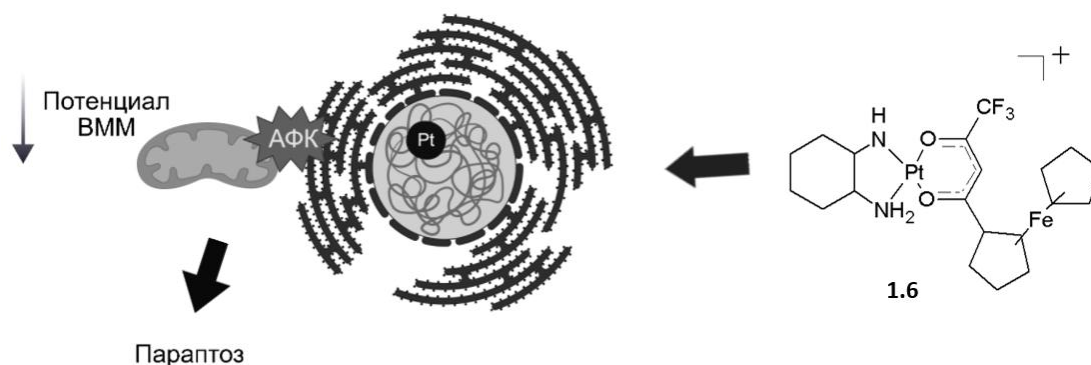


Рисунок 1.12 – Индукция параптоза посредством комплекса платины(II) и его строение

1.3.6. Другие типы клеточной смерти

Помимо вышеупомянутых механизмов (апоптоз, ферроптоз, некроптоз, аутофагия, параптоз), существуют и другие формы регулируемой клеточной смерти, представляющие интерес для преодоления апоптотической резистентности. НЕТоз – форма гибели нейтрофилов, сопровождающаяся высвобождением нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs) [86]. Партанотос – каспазо-независимая гибель, опосредованная гиперактивацией поли(ADP-рибоза)-полимеразы 1 (PARP-1), которая приводит к накоплению PAR, транслокации апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) из митохондрий в ядро и крупномасштабной фрагментации ДНК. Пироптоз – газдермин-опосредованная провоспалительная гибель, активируемая каспазами-1, -4, -5 или -3, характеризующаяся образованием пор в плазматической мембране и высвобождением IL-1 β и IL-18. Митотическая катастрофа – это гибель клетки в результате грубых нарушений митоза, таких как отставание хромосом в мета- и анафазе [87].

Многие из этих путей могут быть задействованы для элиминации опухолевых клеток, устойчивых к классическому апоптозу, индуцируемому препаратами платины, либо путём прямого запуска альтернативных механизмов гибели, либо через модуляцию микроокружения опухоли.

1.3.7. Выводы по разделу

Таким образом, ключевой стратегией преодоления резистентности к апоптозу является использование альтернативных, каспаз-независимых механизмов программируемой клеточной гибели. Некроптоз работает при ингибировании каспазы-8, задействуя альтернативный киназный каскад RIPK1/RIPK3/MLKL. Ферроптоз, не зависящий от каспаз, использует железо-зависимое перекисное окисление липидов, причём резистентные к апоптозу клетки часто проявляют повышенную чувствительность к ферроптозу вследствие нарушенного метаболизма железа. Аутофагия при гиперстимуляции или блокировании финальных этапов может вызывать гибель, которая не требует каспаз, а также способна деградировать антиапоптотические белки (например, BCL2, IAPs). НЕТоз также не зависит от каспаз и запускается альтернативными протеазами (нейтрофильной эластазой), что позволяет элиминировать клетки, блокирующие классический апоптотический путь, параптоз не зависит от каспаз и не ингибируется классическими ингибиторами апоптоза [69–84]. Таким образом, индукция этих каспаз-независимых программ клеточной гибели представляет собой перспективную стратегию для преодоления апоптоз-резистентности при терапии злокачественных новообразований.

В заключении стоит отметить, что комплексы платины, которые индуцируют гибель клеток неапоптотическими путями, представляют собой многообещающее направление терапии в онкологии. Используя такие механизмы, как аутофагия, некроптоз, ферроптоз или параптоз эти

соединения могут преодолеть ограничения традиционных препаратов на основе платины, особенно в случаях лекарственной устойчивости. Интересно отметить, что в литературе описано много примеров взаимодействия платиновых соединений с глутатионом, который отвечает за антиоксидантную систему работы клетки, а также играет центральную роль в приобретении клетками резистентности к терапии [88, 89]. Немаловажно упомянуть, что блокировка глутатиона является одним из основных факторов, способствующих ферроптотической гибели клеток [90]. Таким образом, нацеливание на глутатион потенциально может быть перспективно с двух направлений: первое – индукция ферроптоза как альтернативного, отличного от апоптоза, пути клеточной смерти; второе – преодоление резистентности к существующим препаратам платины, индуцирующим апоптоз.

1.4. Заключение

Таким образом, несмотря на то, что препараты платины(II) (цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин) остаются «золотым стандартом» химиотерапии многих солидных опухолей, их клиническая эффективность часто ограничена развитием первичной и приобретенной резистентности. Ключевыми механизмами этой резистентности являются усиление цитозольной детоксикации (связывание с глутатионом и металлотионеинами), активация систем репарации ДНК (NER), а также блокирование апоптотических сигнальных каскадов. В связи с этим поиск и изучение альтернативных, каспаз-независимых механизмов программируемой клеточной гибели, таких как некроптоз, ферроптоз, пироптоз и параптоз, представляет собой актуальную и перспективную стратегию для преодоления лекарственной устойчивости опухолевых клеток.

В настоящее время разработан ряд соединений на основе платины, способных индуцировать неапоптотическую гибель злокачественных клеток. В этом контексте особого внимания заслуживают комплексы платины(IV). По сравнению с классическими производными платины(II), соединения Pt(IV) обладают рядом преимуществ: они кинетически более инертны, что снижает их нежелательное взаимодействие с компонентами крови и позволяет создавать пролекарства с улучшенной биодоступностью; их структура допускает введение дополнительных биологически активных лигандов (например, ингибиторов антиоксидантной защиты или митохондриально-направленных групп) для усиления специфического действия и обхода механизмов детоксикации. Более того, некоторые Pt(IV) комплексы способны индуцировать не только апоптоз, но и альтернативные типы клеточной гибели (например, некроптоз или ферроптоз), что открывает новые возможности для терапии опухолей, резистентных к традиционным платиновым препаратам.

Однако, несмотря на многообещающие результаты доклинических исследований, на сегодняшний день, ни один из индукторов неапоптотической клеточной гибели не получил

одобрения для клинического применения. Большинство соединений находится на стадии экспериментальных разработок или ранних клинических испытаний, а их эффективность и безопасность в условиях реальной клинической практики требуют дальнейшего изучения. Именно поэтому поиск новых химических структур, способных запускать альтернативные пути гибели неопластических клеток и преодолевать множественную лекарственную резистентность, сохраняет свою высокую актуальность и является одним из приоритетных направлений медицинской химии.

Глава 2. Обсуждение результатов

Для поиска активного противоопухолевого вещества на основе комплексов платины(II), содержащих хлор, была отобрана серия соединений, ранее описанных в литературе. Выбор хлорсодержащих комплексов обусловлен тем, что подобные соединения (например, цисплатин) уже показали высокую противоопухолевую активность и клиническую эффективность. Однако в данной работе были выбраны комплексы с иной, отличной от цисплатина и других применяющихся в настоящее время препаратов платины структурой. Такой подход продиктован предположением, что изменение структуры может привести к иному механизму противоопухолевого действия.

2.1. Объекты исследования – комплексы платины(II)

В качестве объектов исследования была выбрана серия хлорплатиновых комплексов арилпиридинов, так как в литературе была описана противоопухолевая активность похожих соединений *in vitro*, что позволило предположить наличие данных свойств у выбранных соединений. Для получения комплексов платины(II) применялся метод Крэнке [91–96] (схема 2.1)¹.

Первый вариант заключался во взаимодействии пиридиниевой соли **A** (1-(2-оксо-2-(пиридин-2-ил)этил)пиридин-1-ий йодид), полученной из метил-2-пиридил кетона и пиридина в присутствии йода при 2-х часовом кипячении с ацетатом аммония, аддуктами Манниха **B** и избытком ацетата аммония в кипящей уксусной кислоте.

Второй вариант заключался во взаимодействии пиридиниевой соли **A** с халконами **C**, полученными из ацетофенона и альдегида, и избытком ацетата аммония в кипящей уксусной кислоте. В ходе процесса происходит образование йодида пиридиния, α,β -ненасыщенного кетона и последующая циклизация под действием ацетата аммония.

В результате двух вышеописанных реакций были синтезированы гидроксилпроизводные, которые затем подверглись алкилированию с использованием алкилбромидов и карбоната калия кипячением в ацетонитриле при 120 °C в течение 18 часов. Полученные лиганды **2.1a-h** взаимодействием с K_2PtCl_4 в кипящей $AcOH$ были превращены в соответствующие платиновые комплексы **2.2a-h**.

Доказательство строения синтезированных соединений проводили с использованием данных элементного анализа, масс-спектрометрии, спектроскопии ИК и ЯМР, включая одномерные спектры на ядрах 1H , ^{13}C , ^{195}Pt , а также двумерные эксперименты 2D 1H - ^{13}C gHMBC, 2D 1H - ^{15}N gHMBC и 2D 1H - ^{195}Pt gHMBC. Использование комплекса спектральных данных

¹ Синтез изучаемых соединений был проведен в УрФУ к.х.н., доцентом О.С. Ельцовым и инженером В.М. Абрамовым

позволило выполнить однозначное отнесение сигналов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C для всех соединений [96].

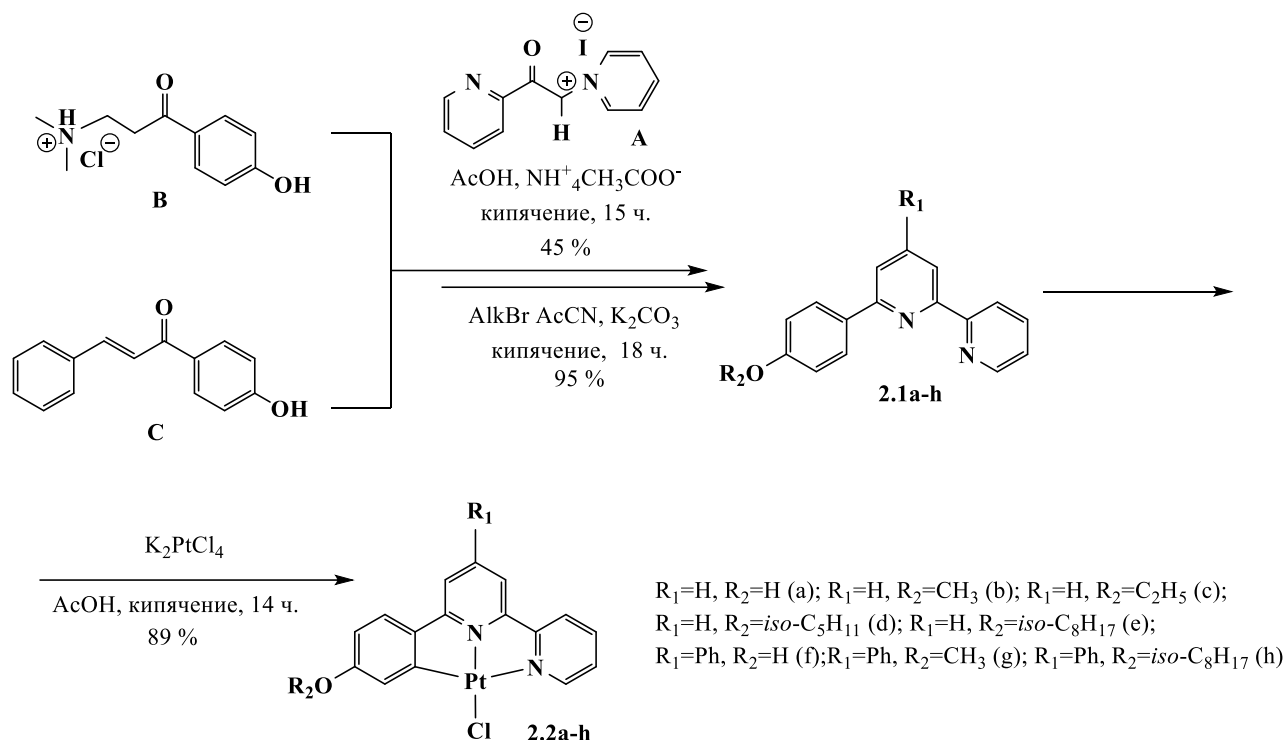


Схема 2.1 – Схема синтеза комплексов платины(II) **2.2a-h**

2.1.1. Биологическое тестирование соединений платины (II)

2.1.1.1. Проверка растворимости

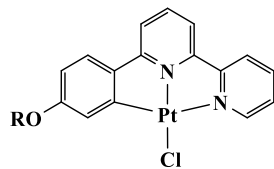
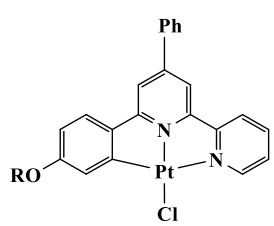
На первом этапе исследования была осуществлена проверка растворимости синтезированных комплексов для определения допустимых концентраций тестирования на культивируемых клетках человека. Растворимость оценивалась в 100 % растворе диметилсульфоксида (ДМСО) с последующим разведением в водном растворе до максимальной выбранной концентрации, равной 48,6 мкмоль/л, таким образом, чтобы концентрация ДМСО в конечном счете не превышала 0,5 % [97–99]. Все комплексы платины растворились в обозначенном диапазоне.

2.1.1.2. Изучение цитотоксичности *in vitro*

На втором этапе исследования противоопухолевой активности была определена цитотоксичность синтезированных комплексов. По результатам МТТ-теста были рассчитаны значения концентраций полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток (IC_{50}), представленные в табл. 2.2. IC_{50} определялась как молярная концентрация вещества, необходимая для снижения жизнеспособности клеточной популяции на 50 % по сравнению с необработанным контролем.

Из таблицы 2.2 следует, что комплексы **2.2a**, **2.2b**, **2.2c**, **2.2f** и **2.2g** не обладают противоопухолевой активностью и IC_{50} для данных соединений превышает максимальную исследованную концентрацию 48,6 мкмоль/л. Комплекс **2.2d** проявляет некоторую активность против клеток глиобластомы A172 ($IC_{50} = 23,2$ мкмоль/л), но он остается неактивным в отношении других клеточных линий, использованных в эксперименте. Однако, несмотря на показатель IC_{50} , превышающий 48,6 мкмоль/л для линии A549, из кривых «доза-эффект» видно, что жизнеспособность культуры падает примерно до 75 % уже на минимальных добавляемых концентрациях, но остается неизменной вплоть до использования самых больших дозировок (рис. 2.1). Это может указывать на некоторый умеренный избирательный цитостатическом эффект данного комплекса в отношении клеток карциномы лёгкого A549.

Таблица 2.2 – Индекс цитотоксичности (IC_{50}) $\pm$ стандартная ошибка (SE) исследуемых хлорсодержащих соединений платины(II) на клетках почки эмбриона человека (HEK293), глиобластомы (A172), карциномы легкого (A549) и карциномы печени (HepG2) человека, мкмоль/л

№	Соединение			Клеточная линия			
	Шифр	Структурная формула	R	A549	HEK293	HepG2	A172
1	2.2a		H	>48,6	>48,6	>48,6	>48,6
2	2.2b		CH ₃	>48,6	>48,6	>48,6	>48,6
3	2.2c		C ₂ H ₅	>48,6	>48,6	>48,6	>48,6
4	2.2d		iso-C ₅ H ₁₁	>48,6	>48,6	>48,6	23,2 ± 1,6
5	2.2e		iso-C ₈ H ₁₇	11,4 ± 1,4	31,7 ± 3,4	24,2 ± 1,9	8,2 ± 1,5
6	2.2f		H	>48,6	>48,6	>48,6	>48,6
7	2.2g		CH ₃	>48,6	>48,6	>48,6	>48,6
9	2.2h		iso-C ₈ H ₁₇	33,0 ± 4,1	41,8 ± 2,7	>48,6	>48,6
10	Цисплатин (препарат сравнения)			24,4 ± 5,4	19,5 ± 2,9	32,2 ± 5,6	4,2 ± 0,5

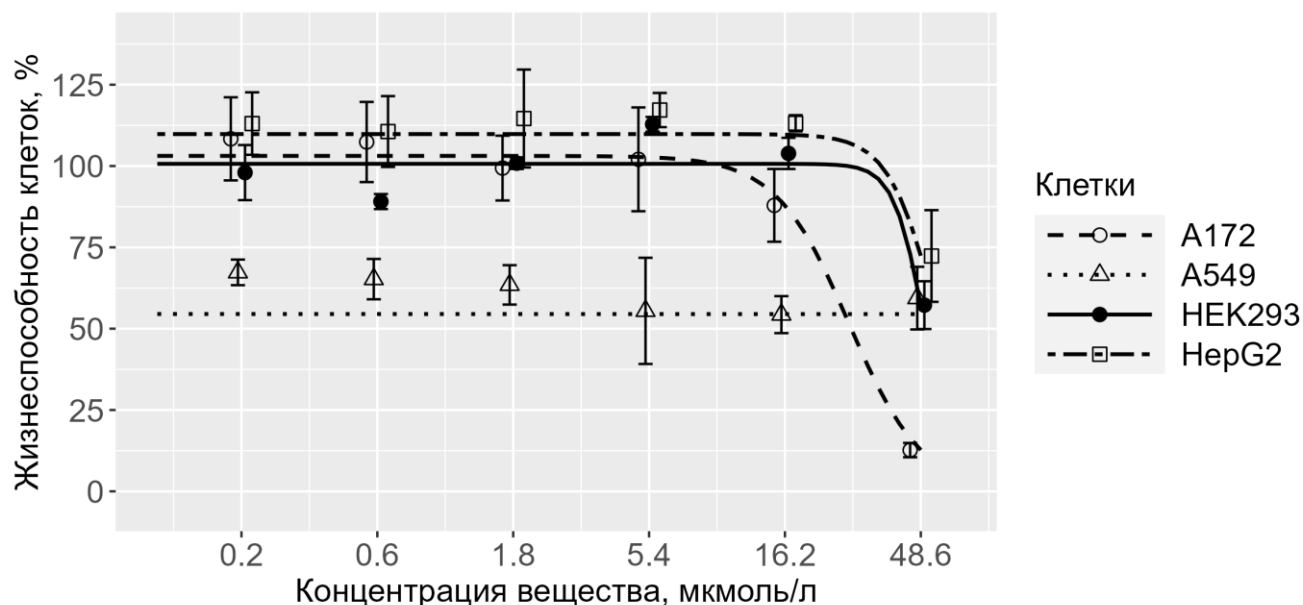


Рисунок 2.1 – Кривые зависимости жизнеспособности клеток от концентрации вещества **2.2d**, $n = 3$, $M \pm SD$

Соединение **2.2h** проявляет слабые противоопухолевые свойства в отношении карциномы лёгкого A549 ($IC_{50} < 33$ мкмоль/л), однако он также влияет на условно-нормальные клетки почки эмбриона человека HEK293 ($IC_{50} < 42$ мкмоль/л) и коэффициент селективности в данном случае меньше 1,3, что говорит о возможной токсичности данного вещества в отношении нормальных клеток человека. По кривым «доза-эффект» также можно отметить отсутствие выраженной активности и снижение жизнеспособности HEK293, сопоставимое с A549 (рис. 2.2).

Необходимо обозначить, что все вышеупомянутые соединения имеют меньшую эффективность, чем цисплатин, применяющийся в настоящее время в медицинской практике для лечения различных типов ЗНО.

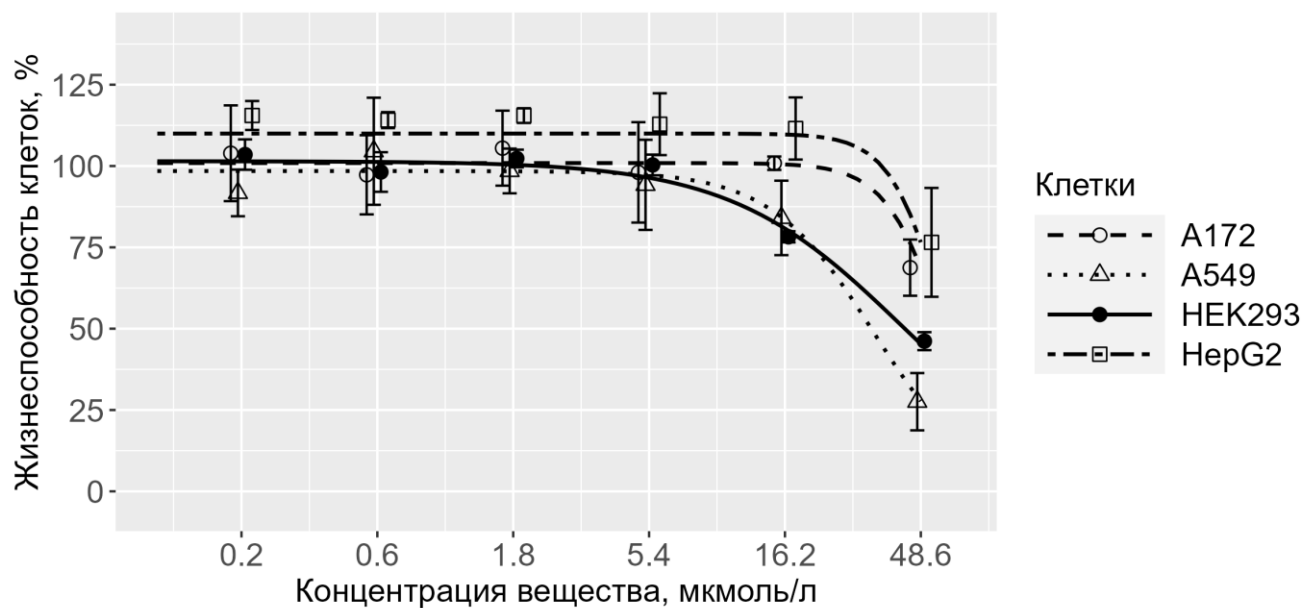


Рисунок 2.2 – Кривые зависимости жизнеспособности клеток от концентрации вещества **2.2h**,
 $n = 3$, $M \pm SD$

Комплекс **2.2e**, в свою очередь, проявляет наибольшую активность в отношении неопластических клеток, в особенности против глиобластомы A172 ($IC_{50} < 8,2$ мкмоль/л). Он также ингибирует жизнеспособность карциномы лёгкого A549 ($IC_{50} = 11,4$ мкмоль/л) и в меньшей степени карциномы печени HepG2 ($IC_{50} = 24,2$ мкмоль/л). Из кривых «доза-эффект» (рис. 2.3b) следует, что **2.2e** обладает некоторой селективностью, так как наблюдается так называемое «фармакологическое окно» между кривой ингибирования жизнеспособности HEK293 и A172, а также HEK293 и A549. Это область концентраций вещества, в которой комплекс оказывает токсический эффект против клеток ЗНО, не влияя при этом на условно-нормальные клетки почки эмбриона человека.

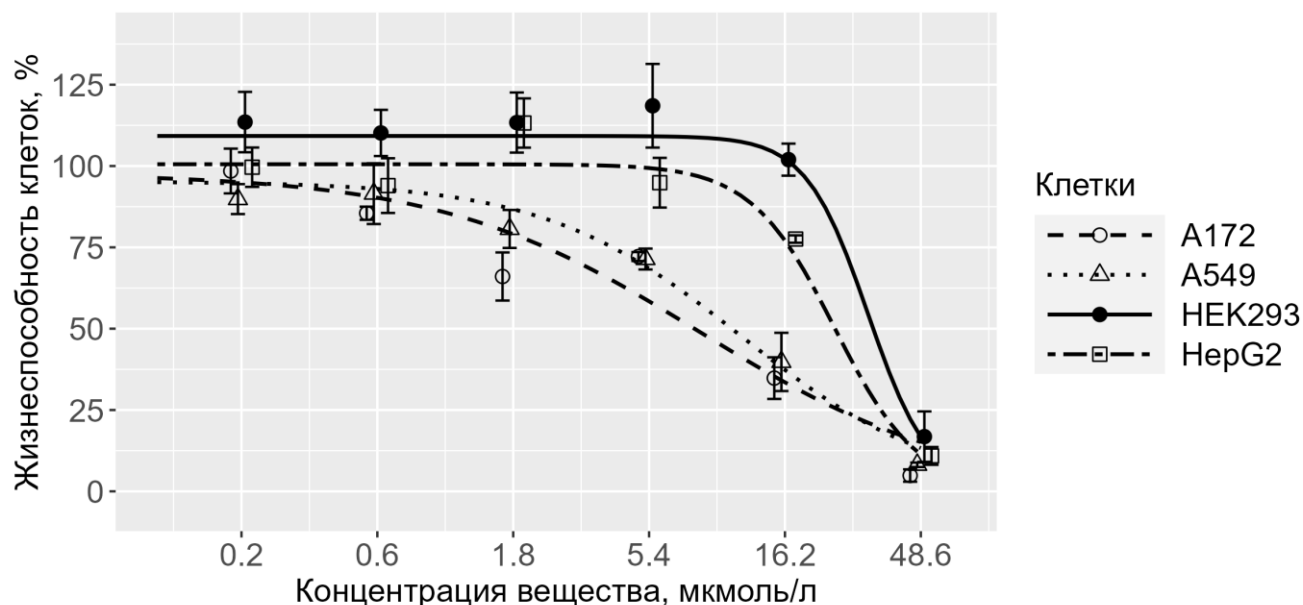


Рисунок 2.3b – Кривые зависимости жизнеспособности клеток от концентрации вещества **2.2e**,
 $n = 3$, $M \pm SD$

Важно отметить, что цисплатин, использовавшийся в качестве положительного контроля, имеет меньшую эффективность в отношении карциномы лёгкого и карциномы печени и, несмотря на меньшее значение IC_{50} и, казалось бы, большую эффективность цисплатина против глиобластомы A172, из кривых «доза-эффект» (рис. 2.4) видно, что у препарата нет столь выраженного «фармакологического окна» и при концентрации, равной концентрации полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток A172, нормальные клетки также подвергаются токсическому действию и больше 25 % из них – погибают. Концентрация цисплатина, способствующая гибели 75 % клеток глиобластомы, способствует снижению жизнеспособности клеток почки эмбриона человека на 50 %. В свою очередь, концентрации **2.2e**, подавляющие жизнеспособность клеток A172 на 50 % и 75 %, не влияют на клетки HEK293, и их выживаемость сохраняется на 100 %-ном уровне [100, 101].

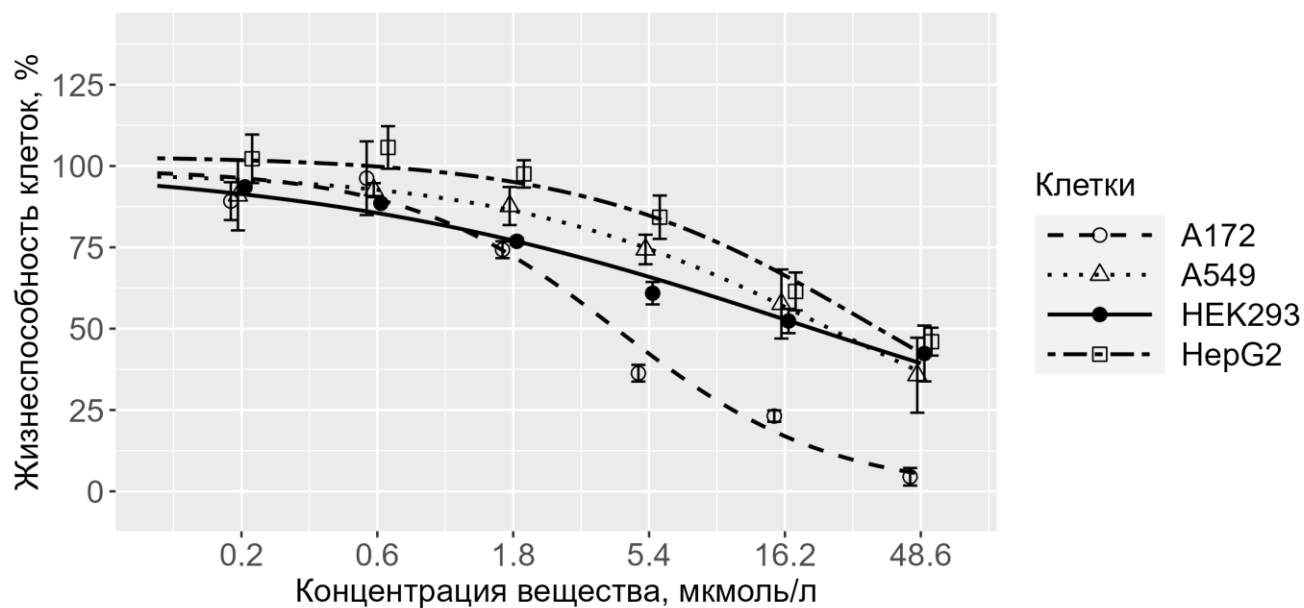


Рисунок 2.4 – Кривые зависимости жизнеспособности клеток от концентрации цисплатина, $n = 3$, $M \pm SD$

Анализ селективности, представленный на рис. 2.5 и рис. 2.6, подтверждает вышеописанные рассуждения. На диаграммах наглядно представлено, что **2.2e** проявляет большую селективность, чем цисплатин, о чем говорят пики, отражающие противоопухолевую избирательность в сравнении с условно-нормальными клетками человека HEK293 и расположенные в области концентрации 16 мкмоль/л. Если для **2.2e** мы видим характерные максимумы (рис. 2.5), то для цисплатина они более сглаженные и, что немаловажно, для линий A549 и HepG2 уходят в отрицательные значения (рис. 2.6) [100, 101].

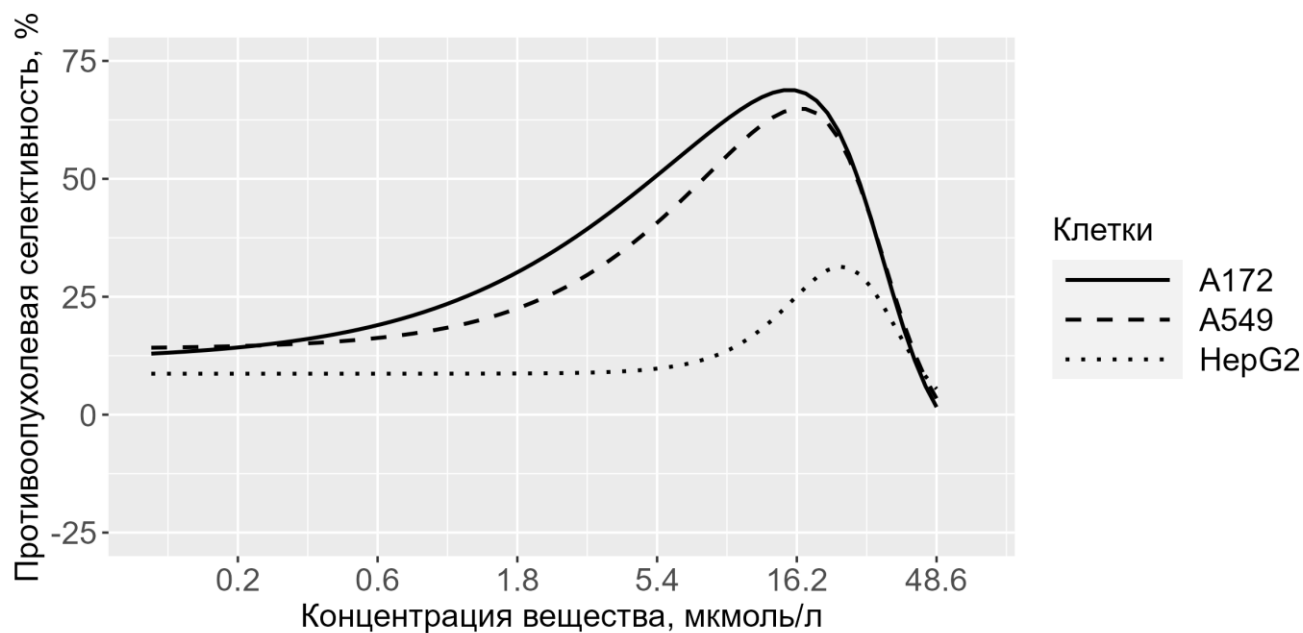


Рисунок 2.5 – Противоопухолевая селективность соединения **2.2e**, представленная как разница кривых «доза – эффект», полученных на условно-нормальных и опухолевых клеточных культурах

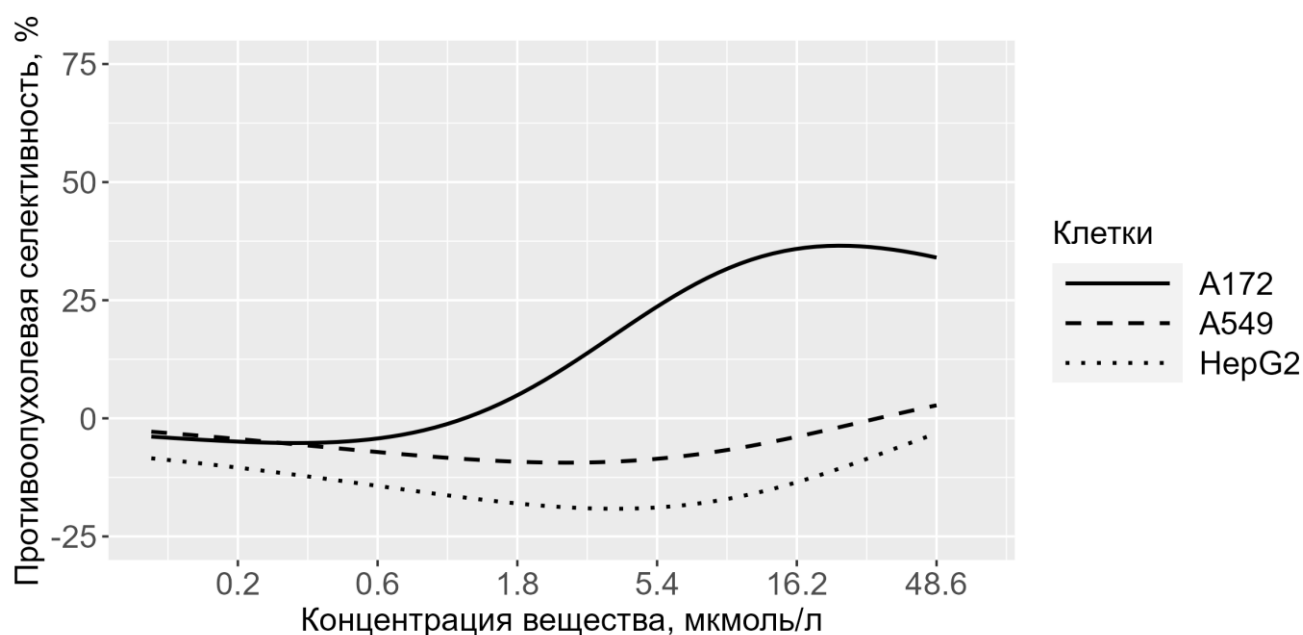


Рисунок 2.6 – Противоопухолевая селективность цисплатина, представленная как разница кривых «доза – эффект», полученных на условно-нормальных и опухолевых клеточных культурах

Исходя из данных по цитотоксичности, был произведен расчет индекса селективности, путем деления показателя IC_{50} для условно нормальных клеток почки эмбриона человека HEK293 на IC_{50} для клеток ЗНО. Полученные данные, представленные в табл. 2.3b, подтверждают

вышеописанные рассуждения: **2.2e** обладает наибольшей активностью в отношении клеток глиобластомы A172 и проявляет селективность ($SI = 3,9$). Цисплатин, в свою очередь, обладает меньшей активностью и селективностью против карциномы лёгкого и печени (A549 и HepG2) и, несмотря на высокое расчётное значение коэффициента селективности для линии A172 ($SI = 4,7$), проявляет токсическое действие в отношении условно-нормальных клеток почки эмбриона человека HEK293.

Таблица 2.3b – Коэффициент селективности (SI) **2.2e** и цисплатина в отношении клеток глиобластомы (A172), карциномы легкого (A549) и карциномы печени (HepG2) человека

Соединение	Клеточная линия		
	A549	HepG2	A172
2.2e	2,8	1,3	3,9
Цисплатин	0,8	0,6	4,7

Таким образом, среди всех синтезированных и протестированных хлорсодержащих комплексов платины(II) можно выделить одно соединение-лидер, обладающее выраженной противоопухолевой активностью и селективностью – **2.2e** (хлорплатинат(II) 6-(4-(2-этилгексил)окси)фенил)-2,2'-бипиридина).

2.1.1.3. Взаимосвязь «структура-активность» (SAR)

Полученные результаты цитотоксичности позволили проанализировать и сделать выводы о взаимосвязи «структура соединения платины – активность». Так, H-; CH₃- заместили (**2.2a**, **2.2b**, **2.2f**, **2.2g**) вне зависимости от наличия фенильной группы в молекуле, остаются неактивными. Более того, установлено, что чем длиннее алкильный фрагмент, тем эффективнее работает вещество. C₂H₅- заместитель еще не дает активности (**2.2c**), в то время как введение *iso*-C₅H₁₁- уже начинает (**2.2d**), а *iso*-C₈H₁₇- (**2.2e**) дает наибольший эффект и наилучшие показатели цитотоксичности, однако только без фенильного фрагмента, так как вещество **2.2h** не сопоставимо с ним по эффективности. Таким образом, можно заключить, что введение фенильного заместителя затрудняет работу комплексов, а наличие более длинных и разветвленных алкильных заместителей, напротив, ее облегчают.

Предполагается, что активность комплексов обусловлена платиной и хлором в структуре, тогда как заместители влияют на растворимость, липофильность и стабильность. Так, судя по всему, в данном случае, фенил снижает липофильные свойства молекул, они хуже проникают в клетки и работают не так эффективно, в то время как более длинный алкильный хвост, наоборот, позволяет комплексу проникнуть в клетку быстрее и атаковать внутриклеточную мишень.

Однако, такая гипотеза требует подтверждения, в отсутствии платины и хлора, лиганд, в таком случае, должен проникать в клетку, но при этом оставаться неактивным. В целях контроля данного утверждения был проведен МТТ-тест на тех же клеточных линиях для лиганда **2.1e**, из которого было получено соединение хит **2.2e**. Результаты анализа представлены в табл. 2.4.

Основываясь на полученных данных, выдвинутая гипотеза была подтверждена: в отсутствии в структуре Pt и Cl молекула оказалась неактивна, показатели IC₅₀ превышают максимальную концентрацию 48,6 мкмоль/л.

Таблица 2.4 – Индекс цитотоксичности (IC₅₀) ± стандартная ошибка (SE) на клетках почки эмбриона человека (HEK293), глиобластомы (A172), карциномы легкого (A549) и карциномы печени (HepG2) человека, мкмоль/л

№	Соединение	Клеточная линия			
		A549	HEK293	HepG2	A172
1	2.1e лиганд	>48,6	>48,6	>48,6	>48,6
2	2.2e комплекс Pt(II)	11,4 ± 1,4	31,7 ± 3,4	24,2 ± 1,9	8,2 ± 1,5

Таким образом, заместители влияют на активность, однако за счет изменения проницаемости внутрь клетки и стабильности, а не за счет прямого влияния на какую-либо внутриклеточную мишень. Важно отметить, что для подтверждения стабильности комплекса **2.2e** в физиологических условиях, с целью получения дополнительных данных для однозначного утверждения того, что активна именно цельная молекула, содержащая в своей структуре металлокомплекс, был проведен ЯМР эксперимент: к раствору 3 мг соединения **2.2e** в 0,5 мл ДМСО-*d*₆ добавили 33 мкл физиологического раствора (соответствует 10 эквивалентам NaCl по отношению к исходному комплексу) и выдержали в течение 45 дней (1080 часов). Изменений сигналов в спектре ЯМР ¹H не наблюдалось, что доказало стабильность комплекса **2.2e** в условиях, близких к физиологическим.

Важно отметить, что наиболее выраженный селективный эффект вещество оказало против клеток глиобластомы (ГБМ). Известно, что ГБМ – самая распространенная опухоль центральной нервной системы (ЦНС). Прогноз для пациентов с ГБМ не является благоприятным: средняя продолжительность жизни составляет 15 месяцев, несмотря на интенсивное лечение, включающее хирургическое вмешательство, лучевую терапию и сопутствующую химиотерапию. В последние десятилетия было проведено множество исследований низкомолекулярных ингибиторов, нацеленных на определенные мишени. Однако, на данный момент, эти исследования не увенчались успехом, и с 2005 года стандарты лечения пациентов с

ГБМ остаются прежними [102]. В связи с этим поиск новых малых молекул в отношении данного типа ЗНО остается актуальной задачей, в связи с чем линия A172 была выбрана в качестве модельной для изучения потенциального механизма противоопухолевого действия соединения-лидера. При этом по кривым «доза-эффект» можно отследить явную разницу между активностью металлокомплекса и лиганда (рис. 2.7). Под влиянием **2.2e** жизнеспособность клеток начинает снижаться уже на минимальных тестируемых концентрациях, в то время как лиганд остается неактивным – под его воздействием клетки сохраняют жизнеспособность на 100 %-ном уровне вплоть до предпоследней дозировки в 16,2 мкмоль/л. Интересно, что на максимальной концентрации, равной 48,6 мкмоль/л, все-же наблюдалось некоторое снижение количества живых клеток, что не исключает, хоть и невесомый, но вклад заместителя в активность. Однако на основании совокупности полученных данных (оценка стабильности, кривые «доза-эффект, показатели IC_{50}) можно сделать однозначный вывод, что противоопухолевое действие оказывает платиновый комплекс, а не лиганд.

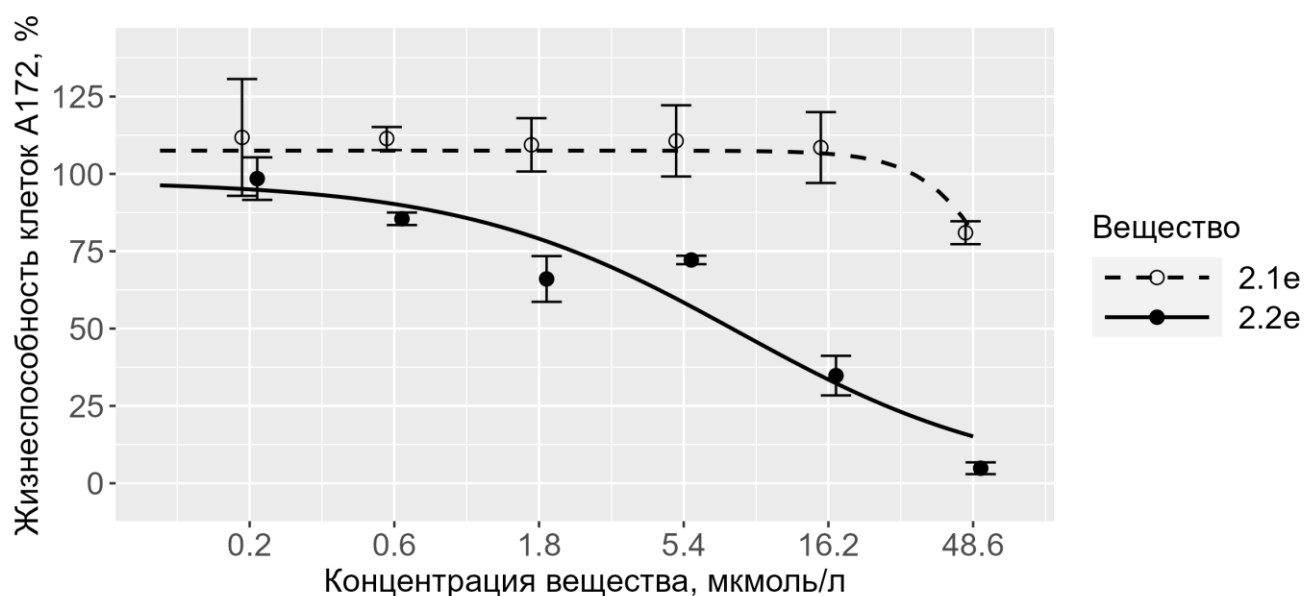


Рисунок 2.7 – Кривые зависимости жизнеспособности клеток от концентрации комплекса **2.2e** и лиганда **2.1e**, $n = 3$, $M \pm SD$

2.1.2. Определение общего противоопухолевого механизма действия соединения-лидера

Следующим этапом работы стало изучение общего механизма противоопухолевого действия соединения-лидера, показавшего наилучшую цитотоксическую активность в МТТ-тесте.

Для всесторонней характеристики механизма были выбраны три ключевых направления. Во-первых, исследовалась способность соединения индуцировать апоптоз, поскольку данный

тип программируемой клеточной гибели является наиболее изученным [27] и распространённым ответом на противоопухолевые агенты [30]. Во-вторых, оценивалась способность комплекса к интеркаляции ДНК, так как все известные платиновые препараты, имеющие клиническое применение или находящиеся на стадии клинических испытаний, реализуют своё действие через образование сшивок с ДНК; учитывая то, что исследуемое соединение также содержит платину, данная гипотеза также требует экспериментальной проверки. В-третьих, измерялся уровень активных форм кислорода (АФК), поскольку выраженный окислительный стресс может указывать на альтернативные механизмы клеточной гибели, отличные от классического платинового механизма, что представляет особый интерес, так как основным существенным недостатком лекарственных средств, вызывающих гибель опухолевых клеток через апоптоз является выработка неоплазиями устойчивости к терапии и поддержание иммортализации через обходные сигнальные пути [31]. И так как общей характеристикой ЗНО является устойчивость к апоптозу, индукция неапоптотически регулируемой клеточной гибели или нацеливание на несколько мишеней (апоптотических и неапоптотических) одновременно становятся новой стратегией разрабатываемых терапевтических подходов.

Таким образом, комплекс выбранных тестов позволяет с разных сторон охарактеризовать предполагаемый механизм действия соединения-лидера. Ниже последовательно представлены и обсуждаются результаты каждого из указанных экспериментов.

2.1.2.1. Индукция апоптоза

Для способности соединения-лидера индуцировать клеточную гибель по типу апоптоза было проведено двойное флуоресцентное окрашивание культивируемых клеток с использованием Аннексина V-FITC и пропидия йодида (PI). Результаты эксперимента представлены в таблице 2.5. На рис. 2.8 приведено процентное распределение клеток, находящихся на разных этапах клеточной гибели (ранний апоптоз, поздний апоптоз, нарушение целостности мембраны).

В контрольной пробе (без воздействия) количество живых клеток (Аннексин V⁻/PI⁻) составило 4316 (94,1 % от общего числа детектированных клеток), при этом количество клеток в ранней (Аннексин V⁺/PI⁻) и поздней (Аннексин V⁺/PI⁺) стадиях апоптоза было незначительным – 100 (2,2 %) и 140 (3,0 %) соответственно, что связано со спонтанным уровнем апоптоза в культуре. Количество клеток с нарушенной целостностью цитоплазматической мембраны (Аннексин V⁻/PI⁺) в контроле составило 32 (0,7 %).

Обработка клеток соединением-лидером привела к изменению соотношения живых и различных групп погибших клеток в культурах. Общее количество живых клеток снизилось до 1292 (80,5 % от общего числа клеток в пробе), что подтверждает цитотоксическую активность

соединения. При этом наблюдалось лишь незначительное увеличение числа клеток в раннем апоптозе до 178 (11,1 %). Количество клеток в позднем апоптозе составило 102 (6,4 %), что близко к контрольному уровню (140; 3,0 %). Уровень клеток с нарушенной целостностью цитоплазматической мембраны остался практически неизменным – 32 (2,0 %) против 32 (0,7 %) в контроле. Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемое соединение индуцирует апоптоз, однако данный эффект является слабо выраженным. Это позволяет предположить, что апоптоз не является основным механизмом гибели клеток под действием соединения-лидера, а выступает скорее сопутствующим процессом.

Таблица 2.5 – Количество клеток, находящихся в раннем апоптозе (АнV+/PI–), позднем апоптозе (АнV+/PI+), погибших иным механизмом (АнV–/PI+) и живых (АнV–/PI–) после воздействия на них соединением **2.2e** и цисплатином в концентрациях, равных IC₅₀ в течение 72 часов

Образец	Аннексин V-FITC + (АнV+/PI–)	Пропидия йодид + (АнV–/PI+)	(Аннексин V-FITC и пропидия йодид) – (АнV–/PI–)	(Аннексин V-FITC и пропидия йодид) + (АнV+/PI+)
2.2e	178	32	1292	102
Цисплатин	426	64	1386	150
Контроль	100	32	4316	140

Для сравнения был использован цисплатин – референсный препарат платинового ряда. В образцах с цисплатином количество живых клеток снизилось до 1386 (68,4 % от общего числа клеток в пробе). Число клеток в раннем апоптозе возросло до 426 (21,0 %), что более чем в 4 раза превышает контрольный уровень и в 2,4 раза – уровень, индуцируемый соединением-лидером. Количество клеток в позднем апоптозе также увеличилось до 150 (7,4 %), а число клеток с нарушенной целостностью мембраны составило 64 (3,2 %), что вдвое выше контрольных значений. Таким образом, цисплатин, в отличие от исследуемого соединения, проявляет выраженную проапоптотическую активность (рис. 2.8).

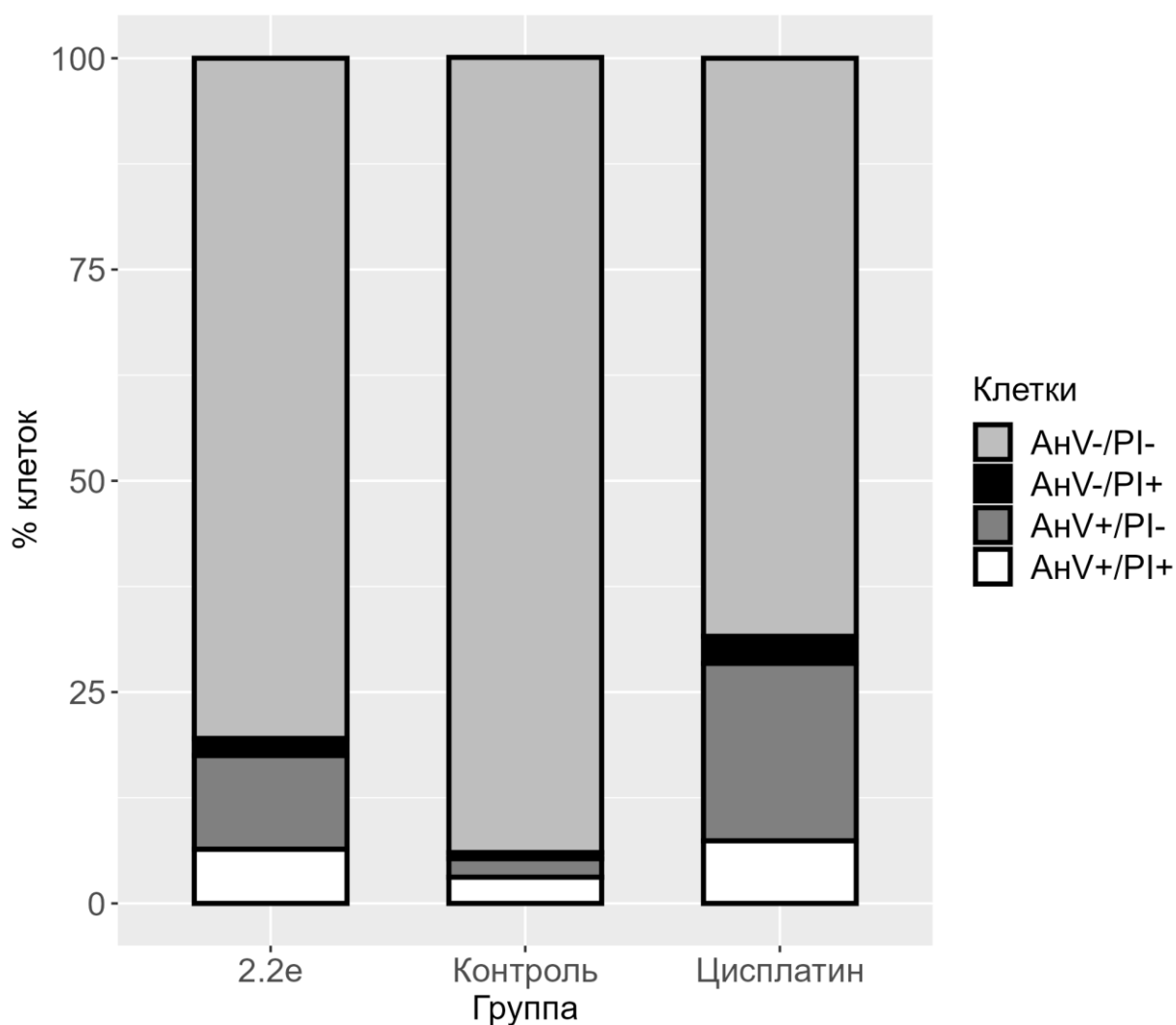


Рисунок 2.8 – Процент клеток глиобластомы линии A172, находящихся в раннем апоптозе (AnV+/PI-), позднем апоптозе (AnV+/PI+), погибших иным механизмом (AnV-/PI+) и живых (AnV-/PI-) после воздействия на них соединением **2.2e** в концентрации, равной IC₅₀ в течение 72 часов

При интерпретации этих данных необходимо учитывать, что общее количество детектированных клеток в пробах различалось. В контроле суммарное число клеток составило 4588, в пробе с исследуемым соединением – 1604 (35,0 % от контроля), а с цисплатином – 2026 (44,2 % от контроля). Это различие представляет особый интерес в свете отсутствия выраженной индукции апоптоза соединением-лидером. Цисплатин, являясь классическим цитостатиком, замедляет пролиферацию клеток и индуцирует апоптоз, что объясняет снижение общего числа клеток в пробе до 2026. Однако соединение-лидер вызывает ещё более значительное снижение общего числа клеток (до 1604), при этом не проявляя выраженной проапоптотической активности.

Таким образом, несмотря на то, что соединение-лидер проявляет цитотоксическую активность, индукция апоптоза для него не является ведущим механизмом. Слабая выраженность апоптотических изменений позволяет предположить, что гибель клеток под действием данного соединения реализуется через альтернативные пути, что согласуется с изначальной гипотезой работы [100, 101].

2.1.2.2. Влияние на активность репликации ДНК и клеточного деления

Известно, что соединения платины, в частности, лекарственные препараты, которые в настоящее время применяются в медицинской практике, такие как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин, образуют сшивки с ядерной ДНК (интеркалируют), тем самым блокируя репликацию и клеточный цикл, в результате чего запускаются необратимые механизмы программируемой клеточной гибели по типу апоптоза [10, 12, 103]. Большинство платиновых комплексов в активных клинических испытаниях (фазы II–III на 2025–2026 гг.) также ориентированы на ДНК-повреждения [36]. Но главный недостаток противоопухолевых соединений, реализующих свой механизм через образование сшивок ДНК и индукцию апоптоза, заключается в сочетании высокой системной токсичности (нефро-, нейро- и ототоксичность) с развитием приобретенной резистентности опухолевых клеток. Устойчивость обусловлена снижением внутриклеточного накопления металла, его инактивацией тиоловыми соединениями (глутатион) [104], а также повышенной эффективностью систем репарации ДНК, что позволяет клеткам восстанавливать платиновые аддукты и блокировать запуск апоптоза, несмотря на первичное повреждение генетического материала [31–37]. В связи с этим, следующим этапом исследования был эксперимент, показывающий влияние соединения-лидера **2.2e** на репликацию ДНК, в том числе в сравнении с цисплатином, который полностью блокирует удвоение генетического материала.

Использование EdU-теста позволило зафиксировать ингибирование синтеза ДНК под действием цисплатина, в то время как соединение **2.2e** не продемонстрировало подавление процесса репликации, что указывает на принципиально иной механизм его цитотоксического действия. Оценка влияния исследуемого соединения на активность клеточного деления на линии глиобластомы A172 показала, что **2.2e** не способствует остановке репликации ДНК и, как следствие, клеточного деления. Полученный результат для **2.2e** – 46,3 % клеток в стадии активного синтеза ДНК – сопоставим с отрицательным контролем (интактная необработанная культура), где делилось 41,8 % клеток (табл. 2.6). В противоположность этому, цисплатин снижал активность клеточного деления. Хотя 15,5 % клеток все еще находилось в стадии репликации ДНК, интенсивность флуоресценции EdU-iF555 была значительно ниже, чем в контрольной группе и в образцах, обработанных **2.2e**.

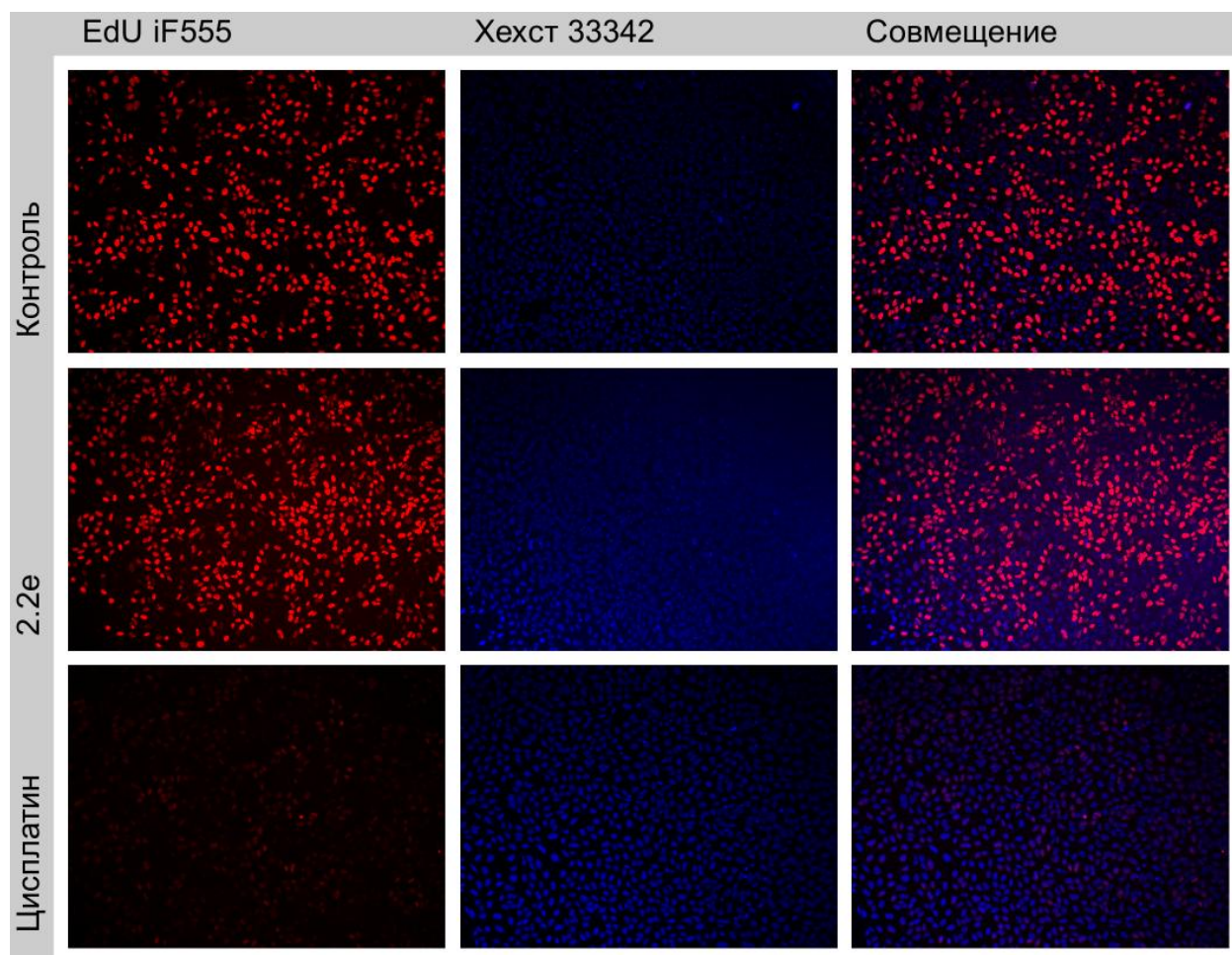
Таблица 2.6 – Процентное содержание клеток глиобластомы A172, находящихся в стадии активной репликации ДНК, $M \pm SE$

Соединение	Процент клеток в S-периоде
2.2e	$46,3 \pm 1,4$
Цисплатин	$15,5 \pm 1,1$
Контроль	$41,8 \pm 1,3$

Данное различие подтверждается как визуальными изменениями на изображениях с наложением слоев, так и статистически значимой разницей между цисплатином и **2.2e** ($p < 0,001$), а также между цисплатином и интактными клетками ($p < 0,001$) – рис. 2.9.

Таким образом, отсутствие блокировки репликации ДНК (то есть тот факт, что клетки продолжают синтезировать ДНК и проходить S-фазу) может свидетельствовать о том, что макромолекула ДНК не является первичной мишенью **2.2e**.

А



Б

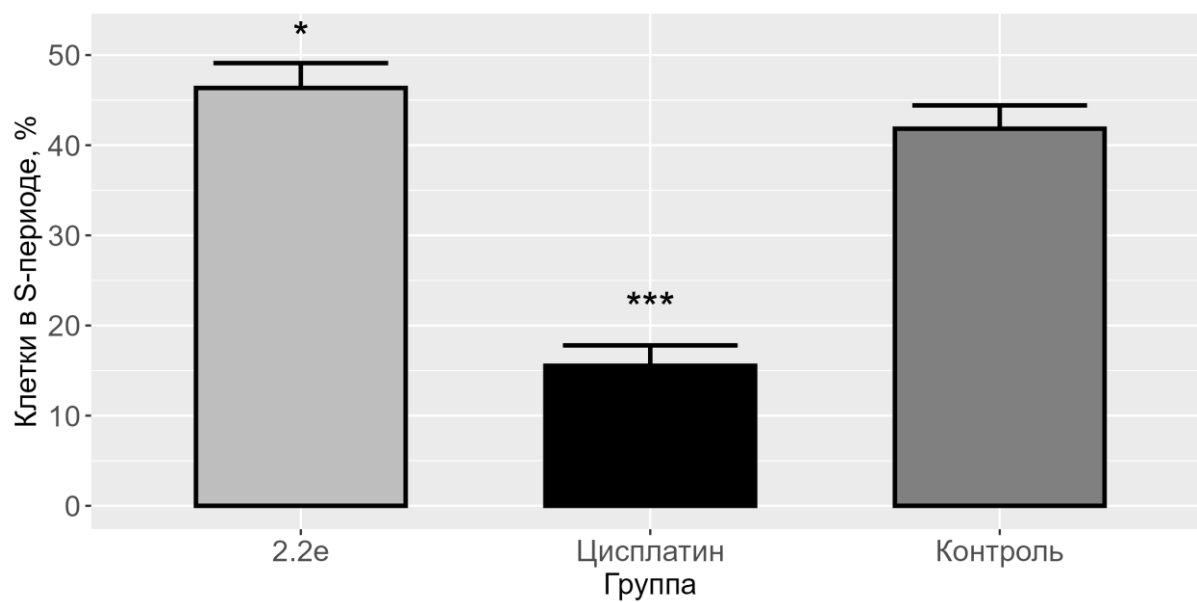


Рисунок 2.9 – Результат окрашивания клеток A172, предварительно инкубированных с 5-этинил-2-дезоксисуридином (EdU), флуоресцентным зондом iF 555. Микрофотографии (А), увеличение 100х. Проценты клеток в S-фазе (Б) $M \pm CI-95\%$ (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)

2.1.2.3. Индукция окислительного стресса

В результате проведённых экспериментов было установлено, что соединение-лидер не проявляет способности к интеркаляции ДНК, что позволяет исключить ДНК в качестве основной мишени его действия. Кроме того, данные по исследованию апоптоза показали лишь незначительное увеличение доли апоптотических клеток, что свидетельствует о том, что апоптоз не является ведущим механизмом гибели клеток под действием данного соединения, а выступает, скорее, сопутствующим процессом. Поскольку ни классический платиновый механизм (повреждение ДНК), ни апоптоз в полной мере не объясняют наблюдаемую цитотоксическую активность, следующим этапом работы стала проверка альтернативной гипотезы – индукции окислительного стресса.

Окислительный стресс является распространённым эффектом, который может быть вызван платиновыми соединениями в клетках [105–107]. Он, в свою очередь, может привести как к апоптозу [108], например, в случае с цисплатином или другими препаратами платины [19], так и к альтернативным путям клеточной смерти [109, 110], что, в данном, случае, представляет особый интерес, так как классический платиновый механизм исключён. Таким образом, было исследовано влияние соединения-лидера на уровень активных форм кислорода (АФК) в опухолевых клетках для более детального изучения механизмов противоопухолевого действия исследуемых соединений.

В результате эксперимента с флуоресцентным красителем H₂DCFDA установили, что **2.2e** индуцирует выработку значительного количества АФК (рис. 2.10). Наличие АФК в опухолевых клетках под действием данного вещества может свидетельствовать о том, что механизм его действия, вероятно, основан на индукции окислительного стресса. Такое повышение уровня АФК может, с одной стороны, напрямую запускать различные программы клеточной гибели, такие как апоптоз, аутофагия, некроптоз или ферроптоз [109–112], а с другой – выступать в роли триггера для иммуногенной гибели клеток [113–115]. Таким образом, наблюдаемый эффект указывает на перспективный прооксидантный механизм действия, направленный на уничтожение опухолевых клеток через нарушение их окислительно-восстановительного баланса.

Интересно отметить, что цисплатин, использовавшийся в качестве препарата сравнения, не приводил к столь выраженной выработке АФК, как **2.2e**, что подтверждает отличия в механизмах действия образцов и делает **2.2e** перспективным противоопухолевым кандидатом [100, 101].

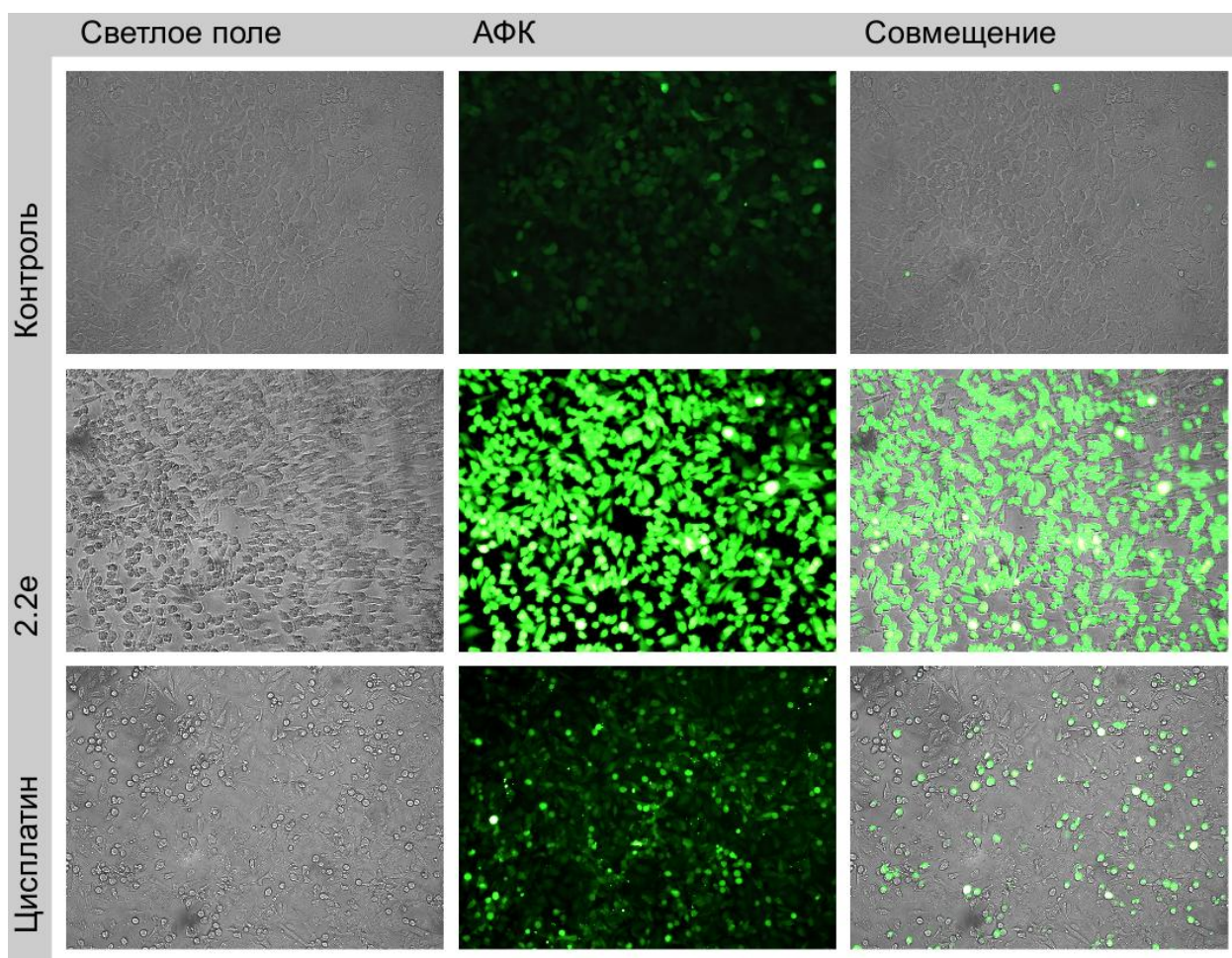


Рисунок 2.10 – Результат окрашивания клеток A172 красителем H_2DCFDA (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат) в концентрации 10 мкмоль/л после 72-часовой инкубации с **2.2e** и цисплатином в концентрации, равной IC_{50} . Увеличение 200х

Основываясь на данных, полученных в предыдущих экспериментах (отсутствие интеркаляции ДНК и индукции апоптоза), можно предположить, что выработка АФК не связана с данными механизмами клеточной смерти. При этом известно, что неконтролируемое образование АФК может быть опосредованно нарушением работы антиоксидантных систем защиты клетки. В литературе описано взаимодействие соединений платины с глутатионом, который является центральным звеном в глутатионовой системе защиты клетки от окисления [88, 89]. Таким образом, возможной мишенью **2.2e** может быть глутатион (GSH), а механизмом биологического действия соединения – ферроптоз, так как известно, что, помимо накопления клеточного железа и перекисного окисления липидов, одним из основных признаков ферроптоза является снижение активности антиоксидантной защиты. Тогда как, система GSH является основным путем, ограничивающим ферроптоз, а ингибирование нижестоящего эффектора глутатионпероксидазы 4 (GPX4) GSH признано классическим путем ферроптоза [73]. Поэтому следующим этапом работы стало подтверждение мишени и основного механизма действия **2.2e**.

2.1.3. Идентификация мишени и характеристика неапоптотического механизма клеточной гибели

2.1.3.1. Изучение механизма индуцируемой клеточной гибели по типу ферроптоза

Для верификации ферроптоза и подтверждения предполагаемого механизма действия, связанного с истощением пула функционально активного глутатиона был необходим комплексный анализ ключевых маркеров, отражающих различные звенья патогенеза: GPX4, NRF2, ACSL4 и HIF1A. Как было отмечено выше, известно, что снижение уровня GPX4 свидетельствует о деградации центрального фермента антиоксидантной защиты и неспособности клетки элиминировать липидные гидроперекиси, что является прямым следствием недостаточности его кофактора – глутатиона. Активация NRF2, проявляющаяся в его стабилизации и ядерной транслокации, отражает запуск компенсаторного транскрипционного ответа в условиях развивающегося окислительного стресса. Сохранение или повышение экспрессии ACSL4 указывает на наличие субстрата для перекисного окисления – полиненасыщенных жирных кислот в мембранах, что является необходимым условием для реализации ферроптотической смерти. Динамика уровня HIF1A при этом служит индикатором метаболической адаптации клетки [116, 117]. В качестве положительного контроля использовался эрастин – классический индуктор ферроптоза, действие которого реализуется через ингибирование системы импорта цистина (система xc⁻) и последующее истощение внутриклеточного пула глутатиона [118]. Выбор эрастина в качестве контроля обусловлен тем, что предполагаемый механизм действия **2.2e** также связан с глутатионовой системой, что позволяет провести корректное сравнение молекулярных изменений, вызываемых исследуемым агентом, с референсным индуктором ферроптоза.

Полученные данные представлены в таблице 2.7 и демонстрируют разнонаправленные изменения экспрессии исследованных белков.

Таблица 2.7 – Изменение экспрессии маркеров ферроптоза в клетках глиобластомы после инкубации с соединением **2.2e**, $M \pm SD$, $n = 3$, % от отрицательного контроля

№	Соединение	Маркер/белок			
		ASCL4	HIF1A	NRF2	GPX4
1	2.2e	90,4 ± 25,8	58,4 ± 20,3	498,0 ± 138,0	8,72 ± 5,73
2	Эрастин	110,0 ± 16,7	135,0 ± 1,6	245,0 ± 91,8	68,2 ± 27,4
3	Контроль	100,0 ± 4,5	100,0 ± 2,8	100,0 ± 42,9	100,0 ± 4,4

Полученные данные позволили выявить серию изменений в экспрессии маркеров ферроптоза:

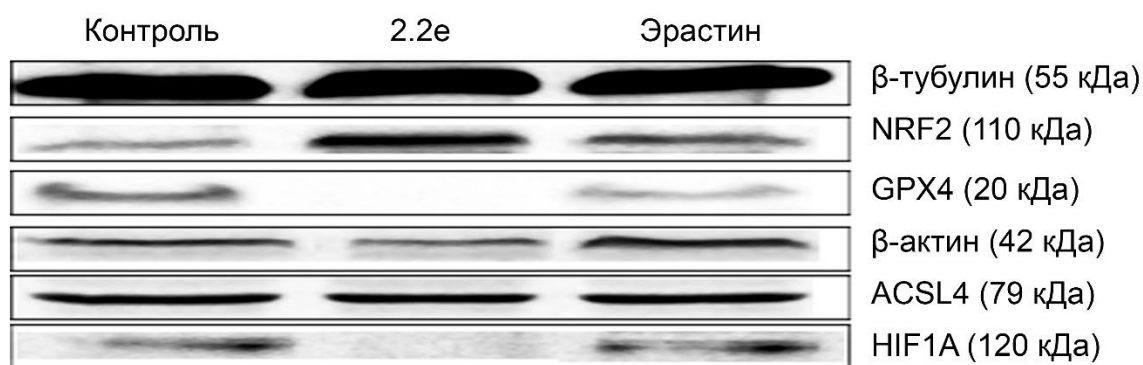
1. GPX4. Наиболее выраженные изменения зафиксированы для центрального фермента антиферроптотической защиты – глутатионпероксидазы 4 (GPX4). Воздействие изучаемого соединения привело к резко выраженной деградации белка: уровень GPX4 снизился более чем в 10 раз относительно контрольных значений ($p < 0,001$). В случае обработки эрастином также наблюдалось снижение GPX4, однако менее выраженное (в 1,5 раза от контроля) – рис. 2.11. Полученные результаты полностью соответствуют литературным данным, согласно которым истощение глутатиона при действии эрастина или его прямой дефицит, вызванный исследуемым соединением, лишает GPX4 необходимого кофактора, что ведет к инактивации фермента и его последующей деградации в условиях развивающегося окислительного стресса [118].

2. NRF2. В ответ на воздействие обоих агентов зафиксирована активация редокс-чувствительного транскрипционного фактора NRF2. **2.2e** вызвал пятикратное увеличение уровня белка ($p < 0,01$ в сравнении с отрицательным контролем), тогда как эрастин – двукратное и без статистической значимости от контроля ($p > 0,05$). NRF2 является регулятором антиоксидантного ответа: его стабилизация и накопление свидетельствуют о развитии окислительного стресса и попытке клетки компенсировать истощение глутатионовой системы путем активации экспрессии генов-мишеней [119]. Более выраженная активация NRF2 под действием **2.2e** согласуется с более глубоким падением GPX4 и указывает на интенсивный редокс-дисбаланс – рис. 2.11.

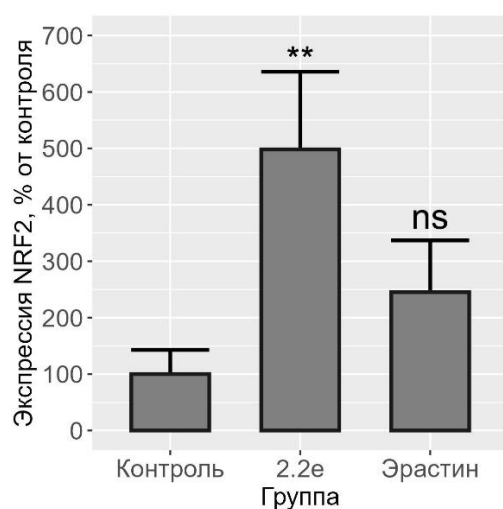
3. ACSL4. Уровень ацил-КоА синтетазы 4 (ACSL4), фермента, обеспечивающего включение полиеновых жирных кислот в мембранные фосфолипиды и тем самым создающего субстрат для перекисного окисления, практически не изменился под действием **2.2e** (0,9 от контроля). Обработка эрастином также не привела к значимым изменениям (1,1 от контроля) – рис. 2.11. Сохранение экспрессии ACSL4 на уровне, близком к контрольному (без статистической разницы в обоих случаях, $p > 0,05$), является важным наблюдением: оно указывает на то, что в клетках присутствует необходимый ферментативный аппарат для генерации субстрата перекисного окисления [73].

4. HIF1A. Динамика фактора, индуцируемого гипоксией (HIF1A), различалась при действии двух агентов. Эрастин вызвал умеренное повышение уровня HIF1A (1,35 от контроля, $p < 0,01$). А **2.2e**, напротив, привел к подавлению HIF1A (0,58 от контроля, $p < 0,01$) – рис. 2.11. Предполагается, что интенсивный окислительный стресс и истощение энергетических ресурсов подавляют трансляцию и HIF-зависимые пути адаптации, что согласуется с деградацией GPX4 и подтверждает редокс-дисбаланс [116, 117].

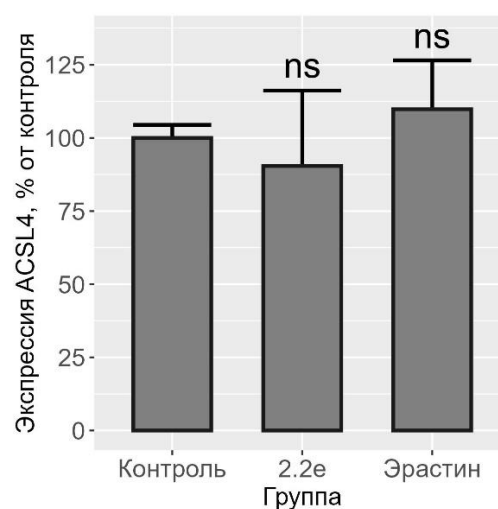
А



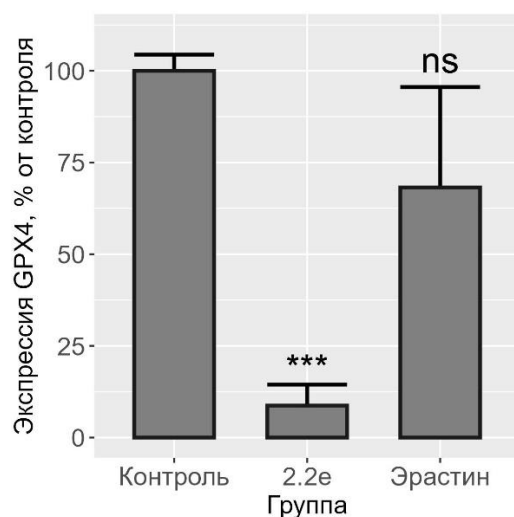
Б



В



Г



Д

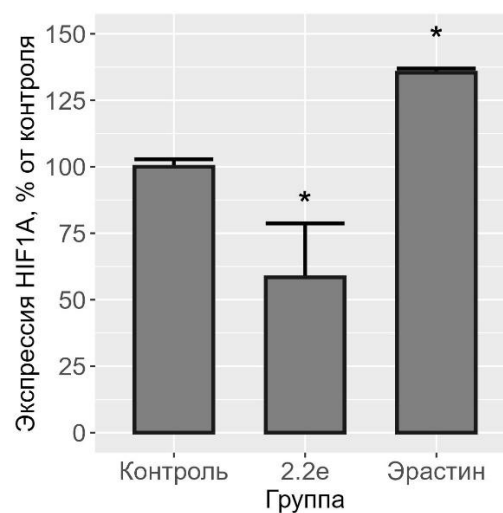


Рисунок 2.11 – Анализ экспрессии маркеров ферроптоза в клетках глиобластомы A172: А – бэнды белковых полосок; Б, В, Г, Д – столбчатые диаграммы, отражающие изменение активности белков в сравнении с инфарктным контролем, принятым за 100 %, $n = 3$, (ns – без статистически значимых отличий; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Совокупность полученных данных – падение GPX4, выраженная активация NRF2, сохранение уровня экспрессии ACSL4 – позволяет уверенно констатировать, что **2.2e** индуцирует гибель опухолевых клеток по механизму ферроптоза. Более того, характер изменений (особенно выраженность снижения уровня GPX4 и степень активации NRF2 по сравнению с эрастином) свидетельствует о том, что мишенью соединения является глутатионовая система, а воздействие на нее превосходит по эффективности референсный индуктор.

Дополнительный анализ экспрессии на уровне мРНК выявил важные особенности, позволяющие глубже понять механизм действия исследуемого соединения. При оценке транскрипционной активности генов, кодирующих ключевые маркеры ферроптоза, было обнаружено статистически значимое повышение уровня мРНК *ACSL4*: более чем в 4 раза под действием **2.2e** и более чем в 2,5 раза под действием эрастина. При этом уровень мРНК *GPX4* в обоих случаях достоверно не отличался от контроля, однако все-таки наблюдалось снижение экспрессии: под влиянием эрастина – до 0,64, а под влиянием **2.2e** до 0,78 (рис. 2.12).

Отсутствие изменений в уровне мРНК *GPX4* на фоне падения количества белка свидетельствует о том, что регуляция GPX4 при индукции ферроптоза происходит на посттранскрипционном уровне. Инактивация фермента вследствие отсутствия кофактора (глутатиона) запускает его деградацию, однако транскрипционная активность гена при этом не страдает – клетка продолжает синтезировать мРНК *GPX4*, пытаясь компенсировать потерю белка. Это хорошо согласуется с литературными данными и подчеркивает, что ключевым событием является именно физическая утилизация уже существующих молекул белка GPX4, а не подавление их синтеза на транскрипционном уровне [73, 118].

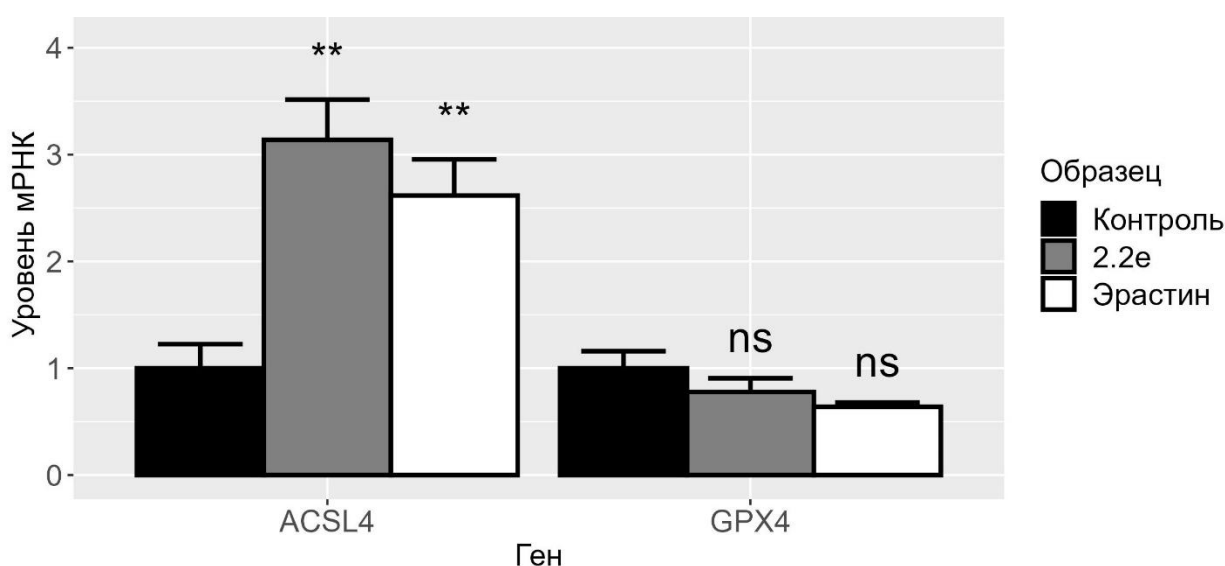


Рисунок 2.12 – Анализ экспрессии маркеров ферроптоза в клетках глиобластомы A172 методом ПЦР в реальном времени, n = 3 (ns – без статистически значимых отличий; **p < 0,01)

При интерпретации разнонаправленных данных об экспрессии ACSL4 (значительный рост мРНК при неизменном уровне белка) необходимо учитывать принципиальное различие в условиях постановки экспериментов. Лизаты для ПЦР-анализа отбирались после 72-часовой инкубации с изучаемым соединением в концентрации, соответствующей IC_{50} , тогда как для вестерн-блоттинга клетки подвергались краткосрочному (2 часа) воздействию в высокой концентрации ($10 \times IC_{50}$). Это методологическое различие не является ограничением, а напротив, позволяет реконструировать временную динамику клеточного ответа и понять последовательность событий при развитии ферроптоза. В условиях краткосрочного воздействия высокой дозы соединения клетка не успевает реализовать транскрипционные программы адаптации. За двухчасовой период основным процессом является инактивация и деградация уже существующих белков – в первую очередь GPX4, что и наблюдается экспериментально. Уровень ACSL4 на этом этапе остается неизменным, поскольку, во-первых, его транскрипционная активация еще не была реализована, а, во-вторых, имеющегося количества фермента достаточно для обеспечения субстратом перекисного окисления на начальных этапах. Высокая концентрация соединения ($10 \times IC_{50}$) обеспечивает максимально быстрое истощение глутатиона и позволяет зафиксировать именно первичные события – деградацию GPX4 и активацию NRF2 – без наложения вторичных адаптивных ответов. К 72 часам воздействия в умеренной (IC_{50}) концентрации клетка активирует транскрипционные механизмы стресс-ответа. Значительный рост мРНК ACSL4 (более чем в 4 раза) отражает попытку клетки модулировать липидный состав мембран в ответ на хронический редокс-дисбаланс, что согласуется с данными о механизмах ферроптоза.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что мишенью действия **2.2e** является глутатионовая система защиты клетки, а индукция гибели реализуется по механизму ферроптоза. Истощение пула восстановленного глутатиона (прямое или опосредованное) приводит к инактивации и последующей деградации GPX4, что в сочетании с сохранением экспрессии ACSL4 создает условия для запуска перекисного окисления липидов. Активация NRF2 отражает компенсаторный стресс-ответ, однако его недостаточно для предотвращения гибели. Расхождение между уровнем мРНК и белка GPX4 подтверждает посттранскрипционный характер регуляции и указывает на то, что критическим событием является утрата активности уже существующих молекул фермента.

Полученные результаты позволяют локализовать мишень на уровне восстановленного глутатиона или выше расположенных регуляторов, однако молекулярный механизм вмешательства требует уточнения. В связи с этим, следующим этапом исследования стало прямое изучение способности **2.2e** взаимодействовать с глутатионом в бесклеточных системах [120].

2.1.3.2. Подтверждение мишени

В качестве одного из наиболее информативных методов исследования пути протекания реакции, подтверждения взаимодействия и структуры полученных продуктов была выбрана ЯМР спектроскопия.

Данные о соотношении реагентов и продуктов в ходе эксперимента для соединения **2.2e** в ДМСО- d_6 представлены на рис. 2.13–2.15. К 8 мкмоль платинового комплекса добавляли 8,5 мкмоль GSH. Избыток глутатиона в реакционной массе составлял 6,25 %. Уже в первые 214 секунд реакции регистрируется значительный расход исходного платинового комплекса, что выражается в резком снижении интенсивности пика при 8.88 м.д. в спектре ^1H ЯМР реакционной массы, принадлежащего протону пиридинового фрагмента 6', близкого к атому Pt..

Образование продуктов и промежуточных соединений в ходе реакции удобно регистрировать по смещению сигнала протонов 6', 11 платинового комплекса и CH_2 протонов GSH при SH группе (рис. 2.13). Так, в первые 214 секунд реакции происходит образование промежуточного продукта, что хорошо заметно по снижению концентрации исходного комплекса (d 8,9 м.д, dd 6.6 м.д) и появлению новых сигналов высокой интенсивности (d 9.2 м.д, 6.5 м.д). Однако уже через 428 секунд интенсивность сигналов данного интермедиата начинает уменьшаться, с появлением пиков продукта (d 9.1 м.д, 6.55 м.д). С началом проявления сигналов продукта отмечается и расходование глутатиона, регистрируемое по смещению сигналов протонов CH_2 при SH группе (dd 2.80 м.д, 2.66 м.д) в слабое поле (dd 3.06 м.д, 2.88 м.д).

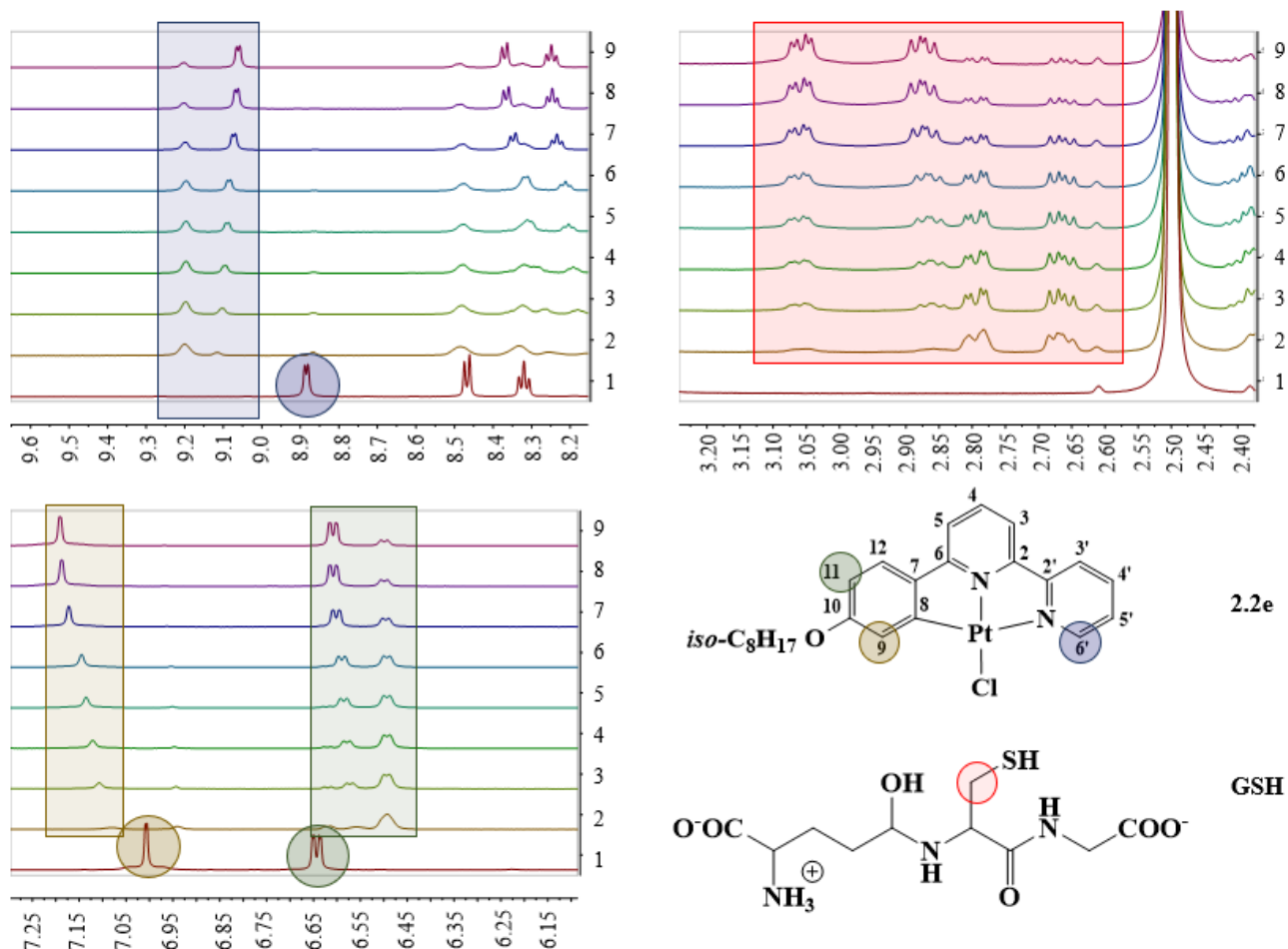


Рисунок 2.13 – Фрагменты ¹H ЯМР спектра: 1) Pt(II) комплекса **2.2e** 2) РМ после 214 секунд с начала реакции 3) РМ после 428 секунд с начала реакции 4) РМ после 642 секунд с начала реакции 5) РМ после 856 секунд с начала реакции 6) РМ после 1070 секунд с начала реакции 7) РМ после 2354 секунд с начала реакции 8) РМ после 5136 секунд с начала реакции 9) РМ после 9146 секунд с начала реакц

Конец реакции регистрировали по окончанию изменения соотношений продуктов реакции при 7276 секунд с момента начала реакции, что подтверждается неизменностью мольных соотношений 1:2 полупродукта и продукта при 7062, 7276 и 21168 секунд с момента начала реакции (рис. 2.14). При этом концентрация исходного комплекса платины составляет менее 3 % от исходной.

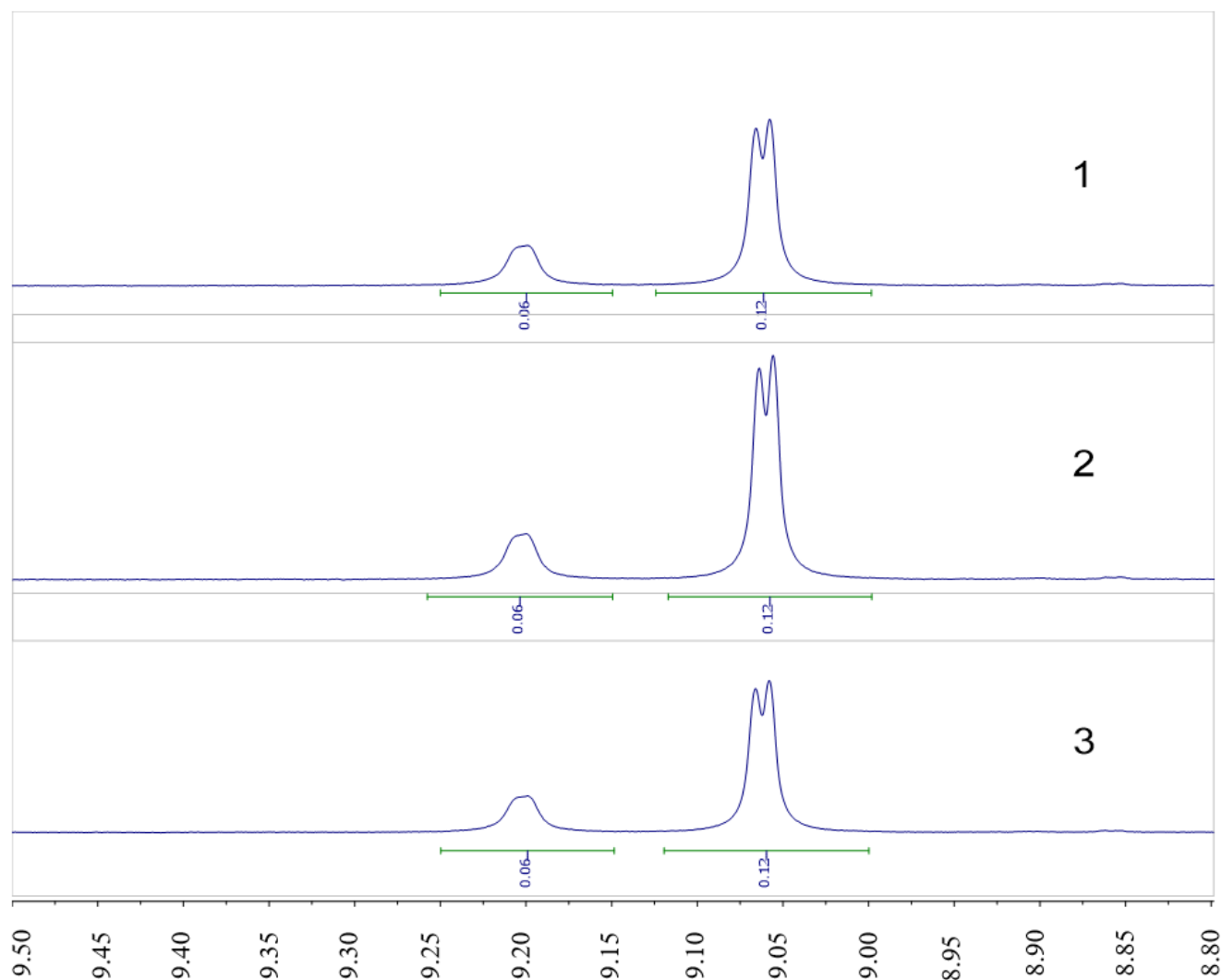


Рисунок 2.14 – Фрагмент ^1H ЯМР спектра: 1) РМ после 7062 секунд с начала реакции 2) РМ после 7276 секунд с начала реакции 3) РМ после 21168 секунд с начала реакции. За 1 принята относительная интегральная интенсивность остаточного пика ДМСО- d_6 (δ_{H} 2.50 м.д.)

Аналогичные результаты были получены при проведении эксперимента в $\text{DMF-}d_7$. К 7,4 мкмоль комплекса платины добавляли 7,5 мкмоль GHS. Ход реакции хорошо прослеживается при рассмотрении сигнала протонов б'. Следует отметить что сигнал при 9.0 м.д принадлежащий исходному соединению убывает медленнее, однако за 7062 секунд в системе устанавливается аналогичное равновесие. Сигнал интермедиата проявляется при 9.50 м.д., сигнал продукта при 9,27 м.д с соотношениями интегральной интенсивности 1:2 (рис. 2.15).

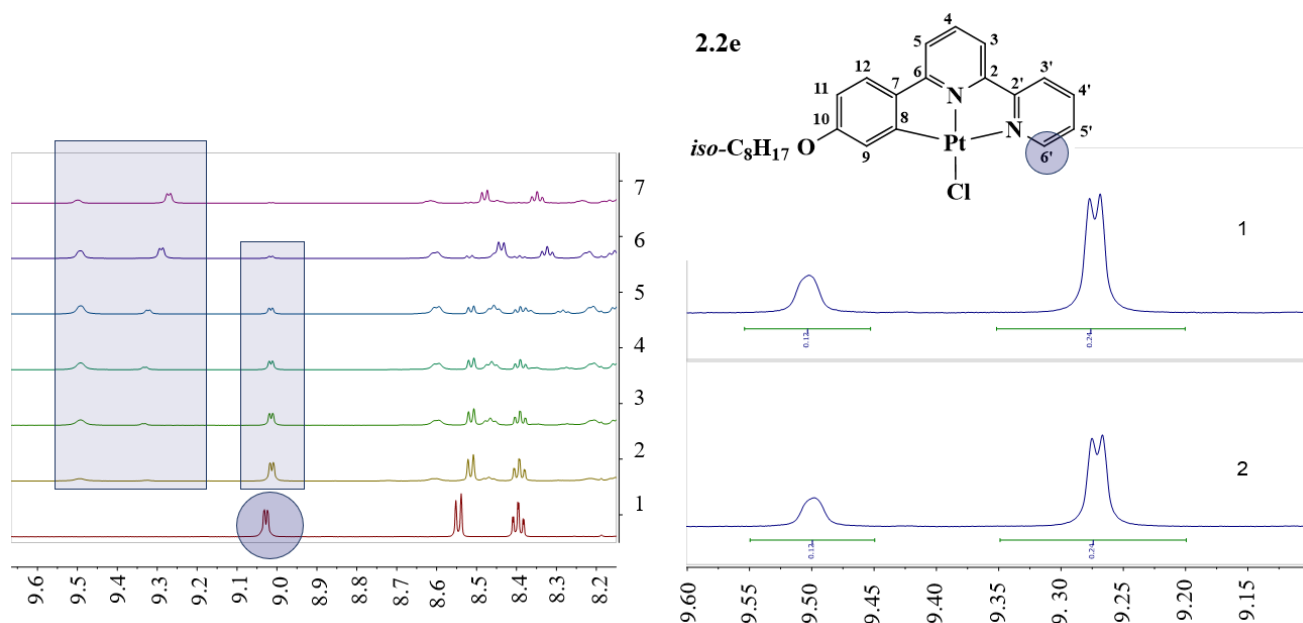


Рисунок 2.15 – Фрагменты ^1H ЯМР спектра: справа – 1) Pt(II) комплекса **2.2e** 2) РМ после 214 секунд с начала реакции 3) РМ после 428 секунд с начала реакции 4) РМ после 642 секунд с начала реакции 5) РМ после 856 секунд с начала реакции 6) РМ после 2354 секунд с начала реакции 7) РМ после 7267 секунд с начала реакции; слева – 1) РМ после 74062 секунд с начала реакции 2) РМ после 7276 секунд с начала реакции. За 1 принята относительная интегральная интенсивность остаточного пика DMF- d_7 (δ_{H} 8.03 м.д.)

Из полученных данных видно значительное смещение химических сдвигов сигналов продуктов реакции в ^1H ЯМР спектрах, по отношению к исходным реагентам, причём данный эффект наиболее выражен для атомов водорода, находяющихся в непосредственной близости от металла-комплексобразователя. Данный факт позволяет выдвинуть предположение о получении платинового комплекса с замещённым Cl- лигандом на GHS. Для подтверждения данной гипотезы были получены спектры ^{195}Pt ЯМР (рис. 2.16) а также двумерный спектр ^1H - ^{195}Pt gHMBC ЯМР (рис. 2.17). Смещение сигнала платины с -3550 до -3676 м.д. говорит об однозначном изменении окружения Pt в соединении. В то же время корреляция протонов GHS при 2.80-3.15 м.д. в спектре ^1H - ^{195}Pt gHMBC с сигналом платины позволяет сделать однозначный вывод об образовании комплекса по S-Pt связи.

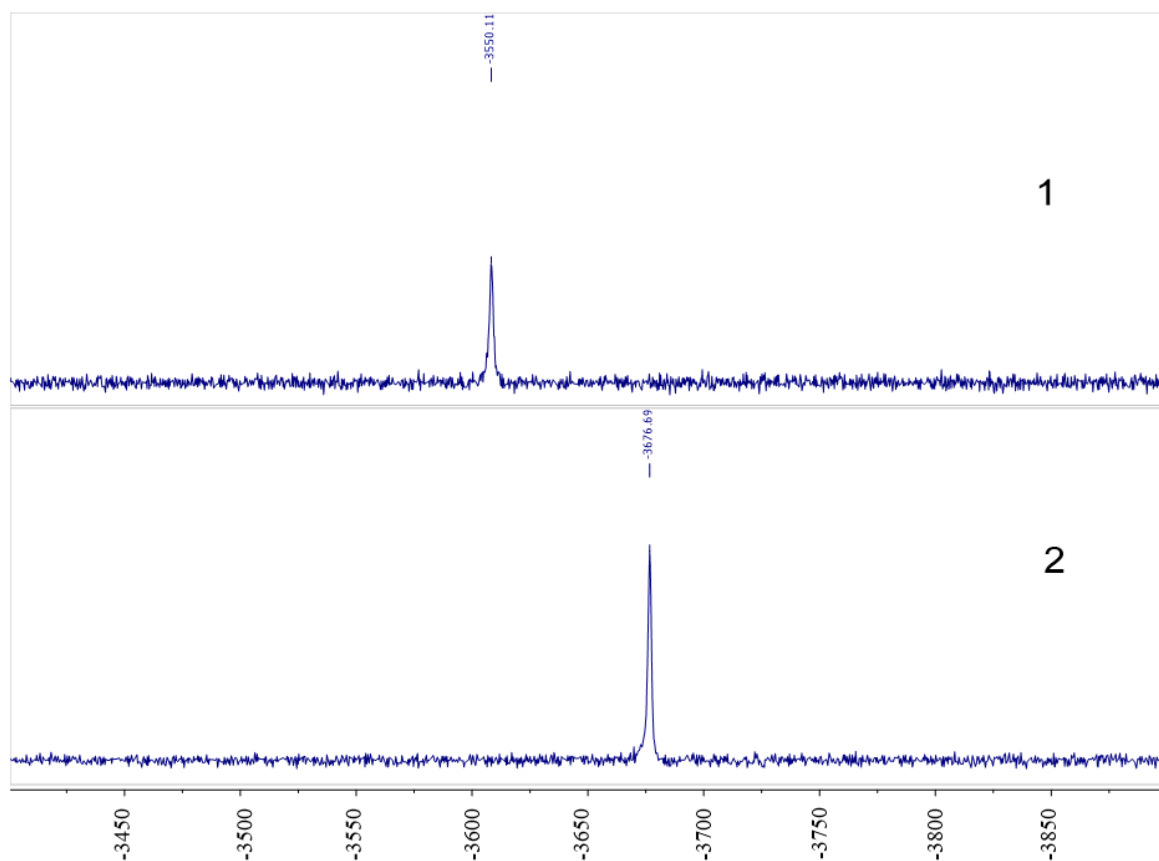


Рисунок 2.16 – ^{195}Pt ЯМР спектр: 1) комплекса **2.2e** 2) комплекса с глутатионовым лигандом

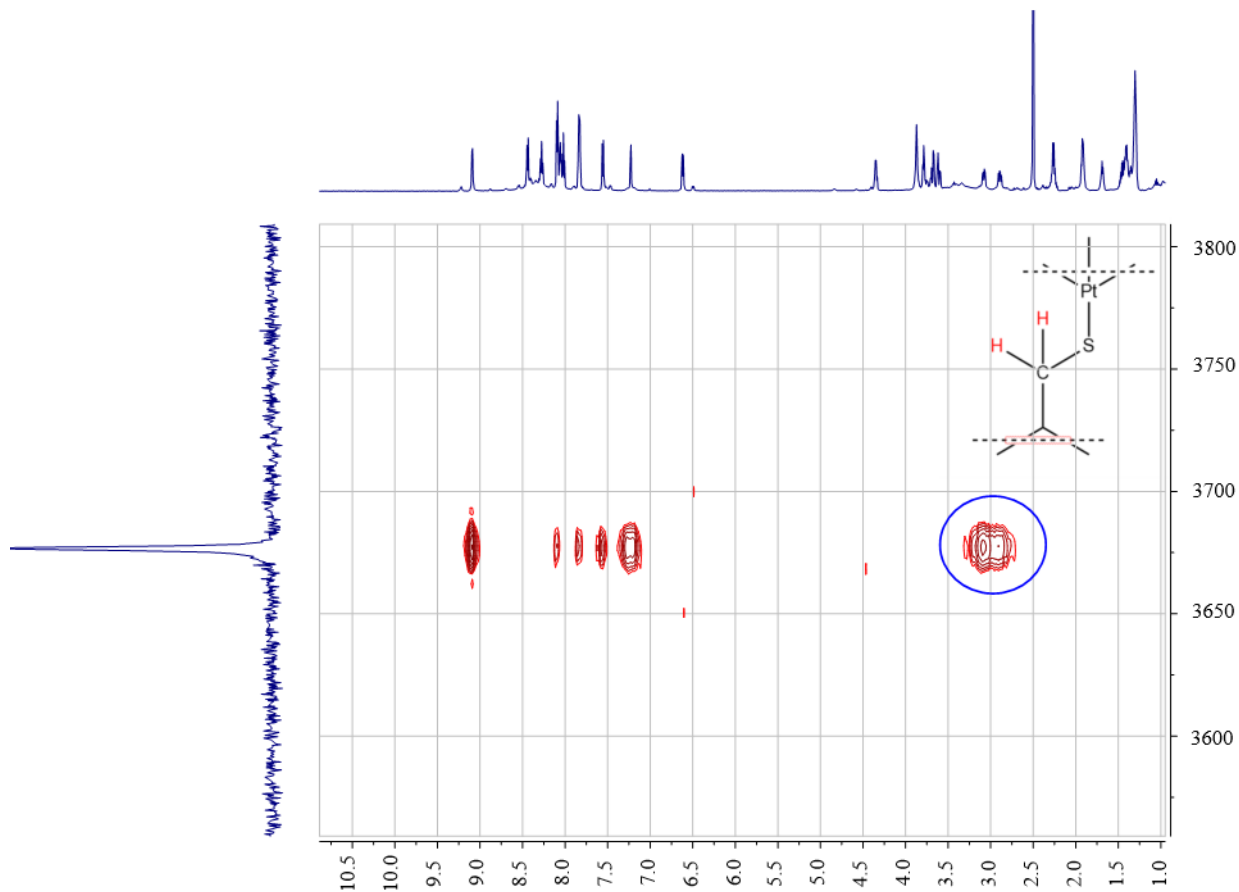


Рисунок 2.17 – ^1H - ^{195}Pt gHMBC спектр комплекса с глутатионовым лигандом

Реакция комплекса платины(II) **2.2e** с GSH представлена на схеме 2.2.

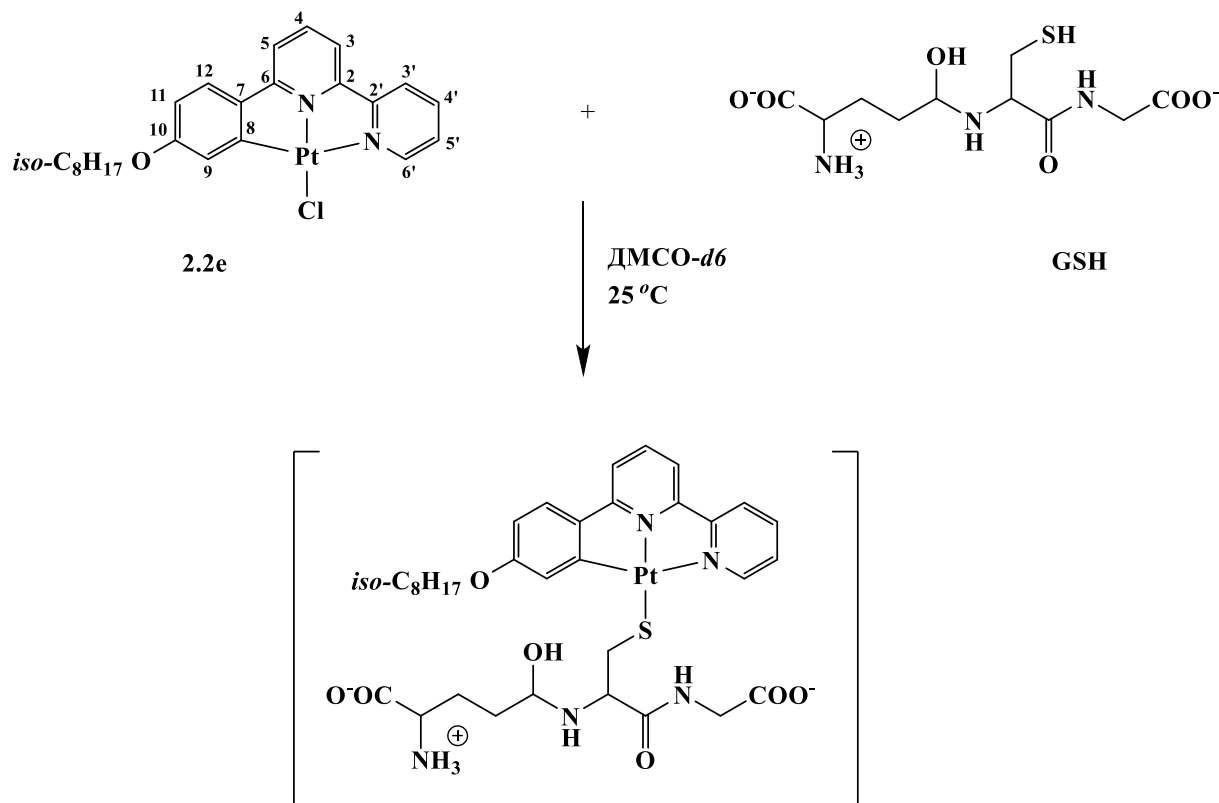


Схема 2.2 – Реакция комплекса платины(II) **2.2e** с GSH

2.1.4. Изучение эффектов, опосредованных ферроптозом и блокировкой глутатиона

После того как мишень и молекулярный механизм действия вещества были установлены, необходимо решить две взаимосвязанные, но разнонаправленные задачи. Во-первых, требуется верифицировать, что реализация данного механизма действительно сопровождается ожидаемыми фенотипическими эффектами на клеточном уровне – это служит дополнительным подтверждением корректности предварительных выводов и позволяет оценить функциональные последствия блокады мишени. Во-вторых, воздействие даже на строго специфичную мишень редко ограничивается каскадом изменений ее непосредственных эффекторов: в силу перекрестных связей метаболических, сигнальных и структурных путей вещество может вызывать косвенные вторичные изменения в системах, напрямую не связанных с мишенью воздействия – таких как энергетический статус митохондрий, изменение морфологических свойств, транскрипционный профиль. Изучение этих «сопутствующих» эффектов не менее важно: оно показывает, насколько глубоко и системно вещество перепрограммирует внутриклеточные механизмы регуляции опухолевой клетки, выявляет потенциальные точки уязвимости (например, митохондриальную дисфункцию). Таким образом, в данном разделе представлены как эффекты, непосредственно следующие из установленного механизма, так и

более широкие изменения клеточного гомеостаза, демонстрирующие интегральный ответ клеток ЗНО на воздействие вещества.

2.1.4.1. Эффекты, ассоциированные с ферроптозом

2.1.4.1.1. Перекисное окисление липидов

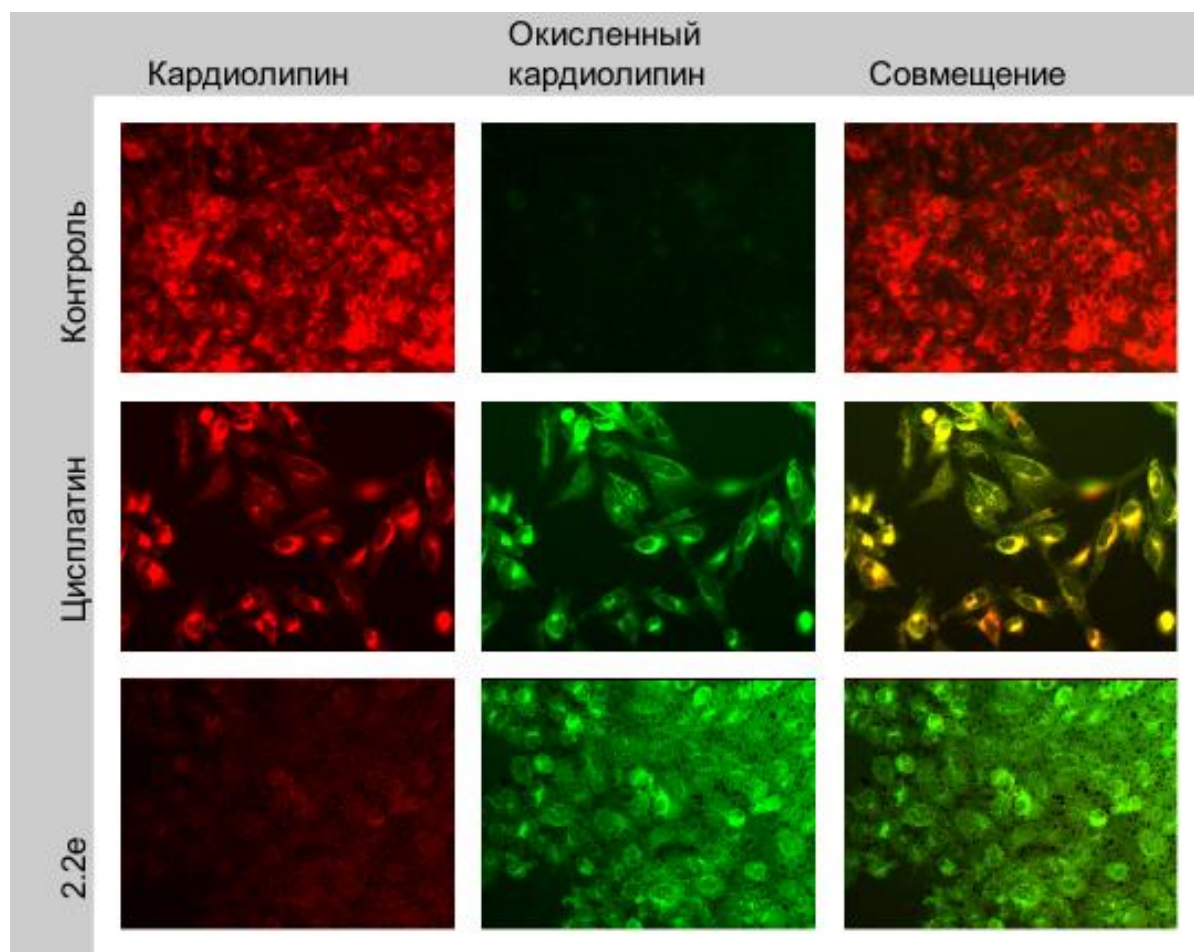
Закономерным экспериментальным подтверждением АФК-опосредованного механизма клеточных дисфункций является исследование перекисного окисления липидов (ПОЛ), так как данный подход позволяет перейти от констатации факта генерации свободных радикалов, которое было показано ранее (раздел 2.1.2.3), к оценке их биологической значимости. Использование митохондриального красителя MitoCLOx [121] дает возможность не просто зафиксировать наличие окислительного стресса, а визуализировать его ключевое последствие – окислительное повреждение липидных мембран непосредственно в митохондриях – главном источнике и одновременно основной мишени АФК. Такой подход убедительно демонстрирует, что индуцированные веществом АФК достигают критически значимых внутриклеточных структур.

Внутренняя митохондриальная мембрана (ВММ) особенно чувствительна к ПОЛ, поскольку содержит как дыхательные ферменты, вырабатывающие АФК, так и легко окисляемые липиды, такие как кардиолипин. В свою очередь, специфическое перекисное окисление кардиолипина, который содержится исключительно во внутренней митохондриальной мембране, может играть важную роль в регуляции некоторых внутриклеточных сигнальных путей [122, 123]. После окрашивания клеток линии A172 красителем MitoCLOx было обнаружено, что комплекс **2.2e** выраженным образом окисляет кардиолипин, содержащийся в митохондриях живых клеток (на 94 % процента от отрицательного контроля, $p < 0,001$). Для сравнения: цисплатин также инициировал окислительный процесс (на 86 % от интактной пробы, $p < 0,001$), однако выраженность его была ниже и имела статистически значимые различия с **2.2e** ($p < 0,001$) – табл. 2.8, рис. 2.17.

Таблица 2.8 – Окисление кардиолипина клеток A172 после воздействия на них **2.2e**, за 100 % принят отрицательный контроль, $M \pm SD$

Соединение	Окисление кардиолипина, %
2.2e	$5,67 \pm 0,82$
Цисплатин	$14,06 \pm 2,19$
Контроль	$100,0 \pm 21,92$

А



Б

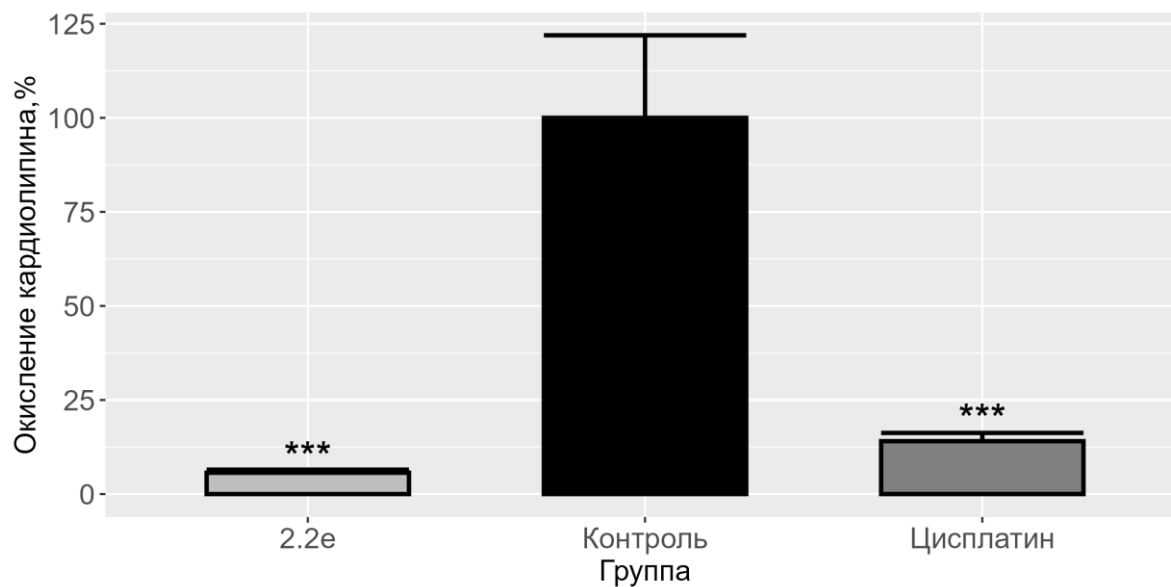


Рисунок 2.17 – Результат окрашивания клеток A172 красителем MitoCLOx в концентрации 200 нмоль/л. (А) – Микрофотографии, увеличение 200х; (Б) – отношение красного и зеленого флуоресцентного сигнала, $M \pm SD$, $n = 4$, за 100 % принято соотношение полученное на интактных (необработанных) клетках, *** $p < 0,001$

Полученный результат подтверждает ранее установленный механизм индукции клеточной смерти под действием **2.2e**, так как наблюдаемое по результатам экспериментальной оценки ПОЛ является еще одним важным признаком ферроптоза. Высокая степень окисления кардиолипина свидетельствует о том, что генерируемые **2.2e** активные формы кислорода достигают липидных мембран и вызывают их повреждение. Окисление кардиолипина – ключевого компонента внутренней митохондриальной мембраны – способствует нарушению ее целостности и дисфункции митохондрий, однако, с высокой долей вероятности, является следствием общего окислительного повреждения внутриклеточных структур, индуцированного соединением, а не результатом специфического нацеливания на митохондрии. Таким образом, **2.2e** реализует свою цитотоксичность через индукцию окислительного стресса, затрагивающего, в том числе, и митохондриальные липиды [120].

2.1.4.2. Сопутствующие изменения

2.1.4.2.1. Молекулярные эффекты, вызванные веществом

Поскольку в условиях окислительного повреждения в клетке активируются стресс-адаптационные механизмы, была проведена оценка экспрессии генов белков теплового шока *HSP27* и *HSP70*, вовлечённых в ответ на окислительный стресс и регуляцию клеточной гибели. Известно, что при ферроптозе может повышаться активность *HSP27* и *HSP70*, однако их повышение не является строго специфичным и, скорее, отражает общий стресс-ответ клетки на окислительное повреждение [124–127]. В соответствии с полученными результатами **2.2e** статистически значимо повышал экспрессию генов *HSP27* и *HSP70* в клетках A172 ($p < 0,001$, рис. 2.18) – в 4 и в 10 раз относительно отрицательного контроля соответственно, что согласуется с данными об индукции АФК и ПОЛ. Таким образом, активация *HSP27* и *HSP70* может рассматриваться как дополнительный признак развития окислительного стресса под действием **2.2e** и, по всей вероятности, указывает на вовлечение ферроптотических механизмов.

Цисплатин, использовавшийся в качестве препарата сравнения, также вызывал статистически значимое повышение экспрессии мРНК *HSP27* и *HSP70* ($p < 0,001$, рис. 2.22) – в 16 и 11 раз от интактной пробы, что говорит о общем стресс-ответе клетки на оказываемое токсическое действие [100].

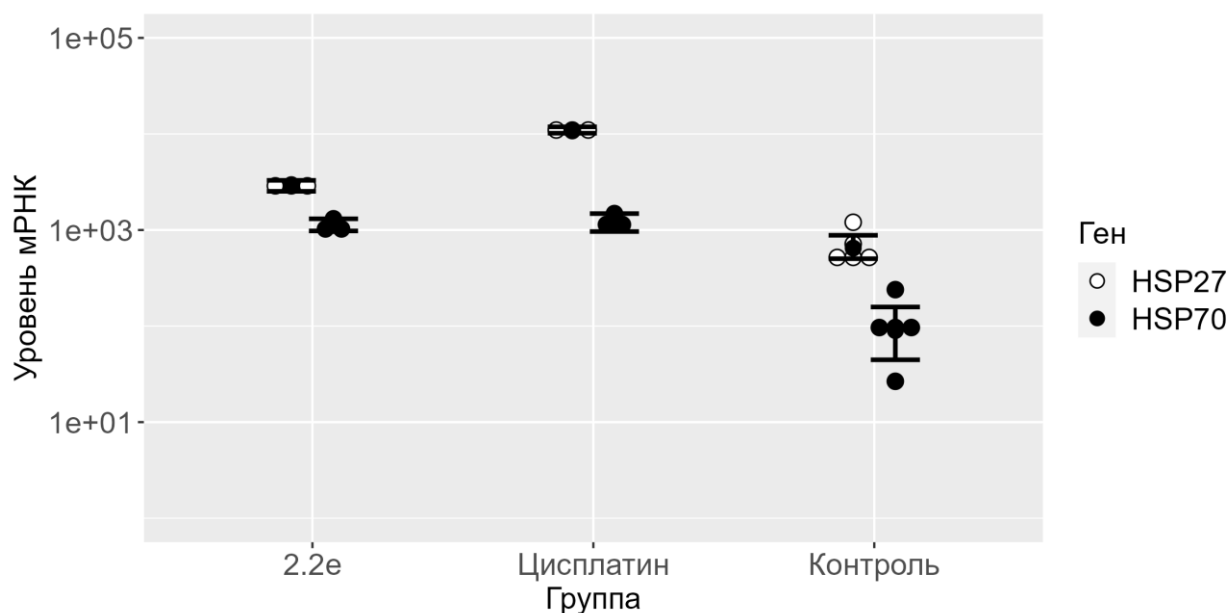


Рисунок 2.18 – Относительная экспрессия генов *HSP27* и *HSP70* в клетках глиобластомы A172 после суточной инкубации с соединениями в концентрации 32 мкмоль/л ($n_{\text{Контроль}} = 5$, $n_1 = 3$)

2.1.4.2.2. Морфологические изменения

Следующим этапом исследования стало изучение изменения морфологических свойств клеток A172, поскольку индукция окислительного стресса, сопровождающаяся выраженным повреждением липидных мембран, неизбежно отражается на клеточной морфологии. Для выявления острых цитотоксических эффектов, связанных именно с окислительным повреждением, а не с отсроченными механизмами (такими как ингибирование репликации ДНК), концентрация **2.2e** была повышена в 10 раз, а время инкубации сокращено до 2 часов. Данный подход позволяет зафиксировать первичные изменения, вызванные массивной генерацией АФК, до запуска вторичных адаптационных или пролиферативных процессов.

В результате окрашивания клеток глиобластомы A172 по методу Романовского – Гимзы установлено, что **2.2e** оказывает выраженное влияние на морфологию культивируемых клеток. Наблюдаемое разрушение клеточных мембран в сочетании с изменением формы клеток и вакуолизацией цитоплазмы, может свидетельствовать о некротическом морфотипе клеточной гибели, что хорошо согласуется с выявленной способностью соединения индуцировать окислительный стресс и перекисное окисление липидов. Примечательно, что ядра клеток при этом сохраняют нормальную структуру без признаков конденсации хроматина. Выявленные морфологические изменения значительно отличаются как от отрицательного контроля (интактные клетки), так и от действия цисплатина, который вызывает преимущественно уменьшение клеточного монослоя без столь выраженной деформации клеток (рис. 2.19). Разница в эффектах, вызванных цисплатином и **2.2e** обусловлена различным механизмом действия веществ.

Активность цисплатина связана с замедлением деления (цитостатический эффект), что приводит к последующему апоптозу и гибели, при этом морфологическая картина включает в себя увеличение размеров клеток, что согласуется с описанными в литературе данными (исследования на меланоме показали, что площадь клетки под действием цисплатина может увеличиваться в 3–4 раза, при этом она теряет свою обычную веретенообразную форму и становится более плоской и широкой, «расползаясь» по поверхности [128]), и уменьшение количества клеток в поле зрения. **2.2e** же проявляет иные эффекты, приводя к разрушению мембраны и вакуолизации цитоплазмы, что согласуется с предположением о ферроптотическом механизме гибели клеток, связанном с нарушением целостности ЦПМ из-за окисления [129].



Рисунок 2.19 – Окрашивание клеток глиобластомы A172 методом Романовского – Гимзы. Перед окрашиванием клетки были обработаны исследуемыми соединениям в концентрациях, равных $10 \times IC_{50}$, и протрукубированы 2 часа. Увеличение 400х

2.1.4.2.3. Влияние на потенциал ($\Delta\Psi_m$) внутренней митохондриальной мембраны (ВММ)

При изучении влияния **2.2e** на потенциал ВММ была использована концентрация 32 мкмоль/л – для получения детектируемого изменения $\Delta\Psi_m$ за 24 часа, что обеспечивает достаточное воздействие на митохондрии в более короткий срок. Данный выбор обусловлен следующими соображениями. Во-первых, изменение $\Delta\Psi_m$ является ранним митохондриальным событием, регистрируемым в течение нескольких часов после воздействия. Во-вторых, использование концентрации, превышающей IC_{50} в 4 раза, гарантирует развитие детектируемого ответа за 24 часа, тогда как концентрация, близкая к IC_{50} , за это время могла бы не вызвать достоверных изменений $\Delta\Psi_m$.

В результате проведения эксперимента установили, что **2.2e** приводит к статистически значимому снижению потенциала ВММ до 32,97 % от контрольных значений ($p < 0,001$), в то время как цисплатин при тех же условиях не вызывает сопоставимых эффектов и $\Delta\Psi_m$ после

обработки им снижется только до 92,66 % ($p > 0,05$). Положительный контроль, в качестве которого использовался СССР, вызывал практически полное падение потенциала ВММ ($p < 0,001$ от контроля) – табл. 2.9.

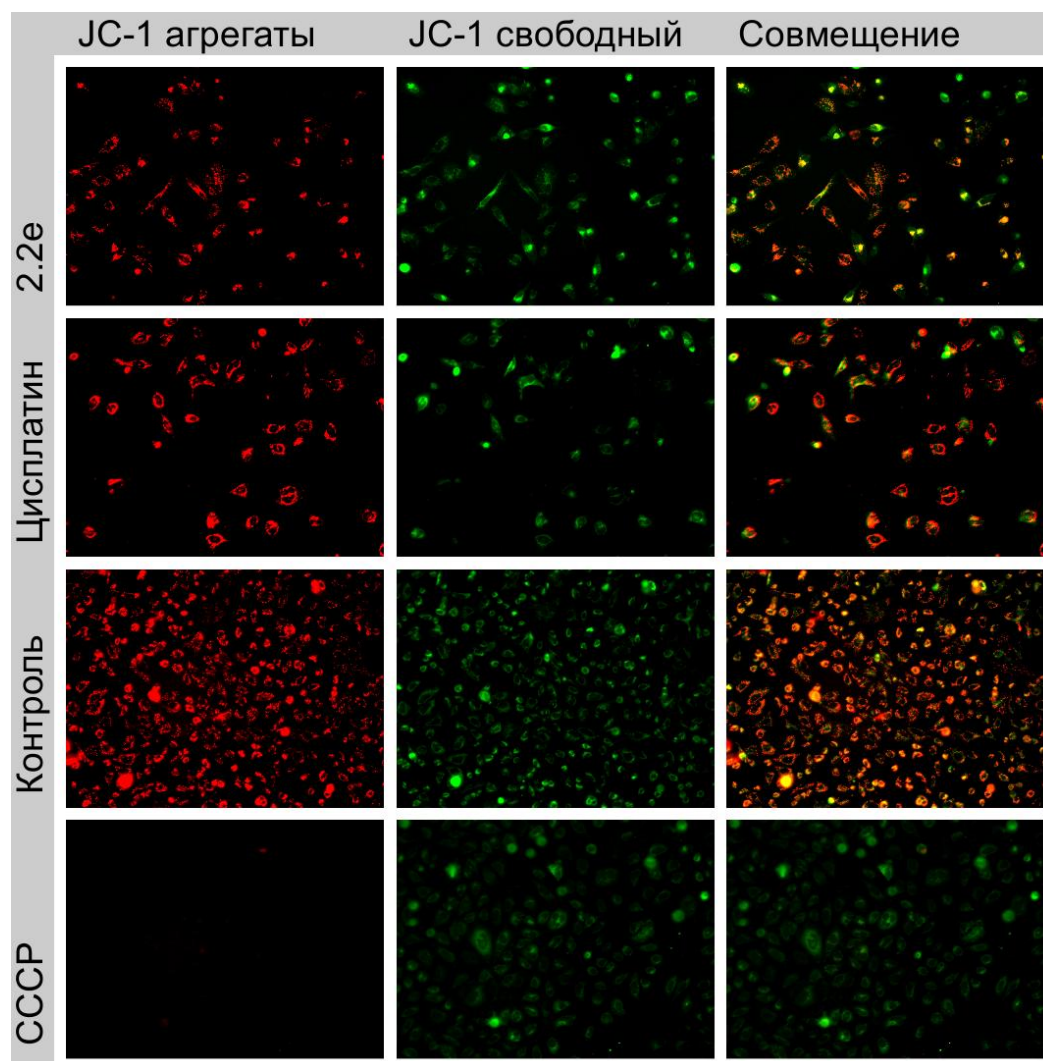
Однако, стоит отметить, что на микрофотографиях видно, что после обработки клеток цисплатином наблюдается уменьшение плотности монослоя в пробе. **2.2e** также вызывает подобный эффект, однако он сопровождается более сильным влиянием на $\Delta\Psi_m$ ВММ (рис 2.20) [130].

Вероятней всего, при обработке клеток **2.2e** происходит накопление повреждений, в том числе митохондриальных мембран и глубокая деполяризация ВММ, которая может быть более выраженной, чем при апоптозе, индуцированном цисплатином. Известно, что митохондрии являются метаболическим центром клетки и отвечают за регуляцию ключевых метаболических процессов, в том числе метаболизма аминокислот, липидов и углеводов, которые тесно связаны с процессом ферроптоза. Кроме того, митохондрии являются основным источником АФК в клетках, и их дисфункция может привести к избыточной выработке АФК, что еще больше усиливает перекисное окисление липидов и ускоряет ферроптоз [131]. Таким образом, дополнительным эффектом **2.2e**, усиливающим цитотоксическое действие, является нацеливание на митохондрии, это, вероятней всего, связано с накоплением липидных пероксидов, повреждением митохондрий и нарушением их целостности, что характерно для поздних стадий ферроптоза [132].

Таблица 2.9 – Состояние потенциала ВММ клеток A172 после воздействия на них **2.2e**, за 100 % принят отрицательный контроль, $M \pm SD$

Соединение	Изменения потенциала ВММ, %
2.2e	$32,97 \pm 7,42$
Цисплатин	$92,66 \pm 29,88$
Контроль	$100,0 \pm 8,13$
СССР	$2,03 \pm 0,39$

А



Б

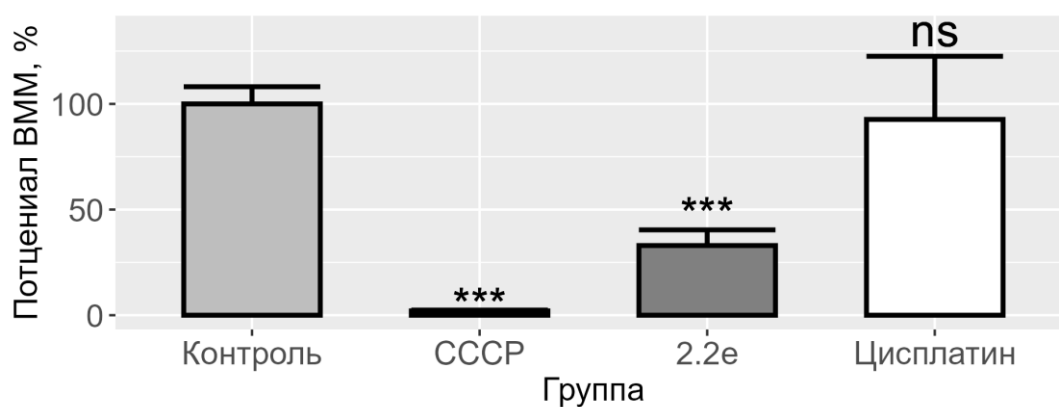


Рисунок 2.20 – Влияние **2.2e** на потенциал внутренней митохондриальной мембраны: (А) – микрофотографии, увеличение 200х; (Б) – отношение красного и зеленого флуоресцентного сигнала, $M \pm SD$, $n = 4$, за 100 % принято соотношение полученное на интактных (необработанных) клетках (ns – без статистически значимых отличий от отрицательного контроля, $p > 0,05$; *** $p < 0,001$)

2.1.4.3. Выводы по эффектам, связанным с индукцией ферроптоза и блокировкой глутатиона

В результате изучения эффектов, опосредованных **2.2e**, установлено, что вещество вызывает выраженное перекисное окисление липидов мембран митохондрий, что согласуется с ферроптотическим профилем индукции клеточной смерти и подтверждает установленный механизм. Верификация механизма позволяет заключить, что **2.2e** является перспективным фармакологическим агентом, так как с одной стороны, открывает возможности к лечению лекарственно-устойчивых видов злокачественных новообразований как моно-препарат с альтернативным механизмом индукции клеточной смерти, а с другой стороны, потенциально может быть использован в комбинированной терапии для нацеливания на глутатион, который играет одну из ключевых ролей в выработке приобретенной резистентности, в том числе к препаратам платины [40]. Блокировка глутатиона и индукция ферроптоза посредством **2.2e** приводит к выраженным морфологическим изменениям, снижению потенциала ВММ и повышенной экспрессии белков теплового шока.

2.1.4.4. Модуляция эффектов соединения антиоксидантом

Исходя из полученных данных, демонстрирующих что соединение **2.2e** индуцирует гибель опухолевых клеток через окислительный стресс, блокируя глутатионовую систему защиты клетки, была проведена оценка его цитотоксического действия в присутствии и в отсутствии антиоксиданта N-Ацетил-L-цистеина (NAC). Проведенные эксперименты позволили дополнительно подтвердить глутатион-зависимый механизм действия вещества и установить взаимосвязь между эффектами **2.2e** и присутствием или отсутствием антиоксиданта в системе.

Выбор NAC в качестве модулятора окислительно-восстановительных процессов обусловлен его ролью предшественника цистеина – ключевого субстрата, лимитирующего скорость синтеза глутатиона. Глутатион синтезируется в клетке из трех аминокислот в два этапа. Ключевым ферментом первого этапа является глутамат-цистеин-лигаза (GCL), соединяющая глутаминовую кислоту и цистеин. Именно доступность цистеина чаще всего определяет, как быстро и в каком количестве будет синтезироваться глутатион. Без достаточного количества цистеина синтез глутатиона подавляется [133].

В результате исследований было установлено, что цитотоксическая активность **2.2e** зависит от функционального состояния глутатионовой системы. Так, в отсутствии NAC потенциал ВММ снижался до 57 %, в то время как добавление антиоксиданта возвращало состояние потенциала в норму, даже в некоторой степени превышающую отрицательный контроль – 116 %. Эффект от цисплатина, в свою очередь, не зависел от наличия или отсутствия

НАС, потенциал снижался до 45 и 49 % соответственно. СССР, использовавшийся в качестве положительного контроля, ингибировал $\Delta\Psi_m$ до 21 % в обоих случаях (табл. 2.10).

Интересно отметить, что полученные результаты отличались от результатов эксперимента на потенциал ВММ, описанного в п 2.5.2.3b, что связано с разным дизайном эксперимента. В данном случае использовались концентрации, равные IC_{50} , которые были необходимы для достижения умеренного токсического эффекта и демонстрации зависимости от НАС, а в предыдущем варианте были взяты токсические дозировки с уменьшением времени ингибирования клеток с веществами, что позволило показать вызываемые ими эффекты. Инкубация с цисплатином в концентрации 32 мкмоль/л в течение 24 часов не приводила к снижению митохондриального мембранного потенциала. Однако при концентрации 4,2 мкмоль/л и увеличении экспозиции до 72 часов наблюдалось падение $\Delta\Psi_m$. Это указывает на времязависимый характер цитотоксичности цисплатина: его повреждающее действие развивается не сразу, а обусловлено механизмом действия, включающим связывание с ДНК и последующий запуск апоптоза, для чего клеткам необходимо время. Для **2.2e** же наблюдался противоположный эффект, что подтверждает различия в механизмах работы соединений. В данном случае цитотоксичность обусловлена не связыванием с ДНК и последующим запуском апоптоза, а прямым повреждением клетки, например, индукцией неапоптотической гибели.

Таблица 2.10 – Состояние потенциала ВММ клеток A172 после воздействия на них **2.2e** в присутствии и в отсутствии антиоксиданта, за 100 % принят отрицательный контроль без НАС, $M \pm SD$

Соединение	Изменения потенциала ВММ, %	Антиоксидант
2.2e	$116,88 \pm 34,80$	НАС 3 Ммоль/л
	$57,25 \pm 9,73$	Без НАС
Цисплатин	$45,47 \pm 5,45$	НАС 3 Ммоль/л
	$49,45 \pm 11,42$	Без НАС
Контроль	$88,96 \pm 7,55$	НАС 3 Ммоль/л
	$100,00 \pm 24,54$	Без НАС
СССР	$21,85 \pm 3,00$	НАС 3 Ммоль/л
	$21,46 \pm 1,34$	Без НАС

Как представлено на столбчатой диаграмме (рис. 2.25), при добавлении экзогенного НАС эффективность **2.2e** полностью нивелировалась: жизнеспособность клеток не отличалась от

отрицательного контроля ($p > 0,05$). Это свидетельствует о том, что в условиях повышенной доступности цистеина клетки способны нейтрализовать окислительный стресс, индуцируемый исследуемым соединением. **2.2e**, как и цисплатин, при 72-часовой выдержке в концентрациях, равных IC_{50} , вызывал выраженное снижение $\Delta\Psi_m$. Добавление NAC полностью предотвращало падение $\Delta\Psi_m$, вызванное **2.2e**, возвращая его к уровню отрицательного контроля ($p < 0,001$ по сравнению с группой, обработанной только **2.2e**). При этом NAC не влиял на способность цисплатина и СССР (положительный контроль) снижать $\Delta\Psi_m$ (рис. 2.21), что подчеркивает специфичность исследуемого механизма действия **2.2e**, связанного с истощением внутриклеточных тиолов.

На микрофотографиях также видно, что потенциал $\Delta\Psi_m$ выражено снижается как под действием как **2.2e**, так и цисплатина. СССР, использовавшийся в данном случае как положительный контроль, также приводит к выраженному снижению $\Delta\Psi_m$. При этом важно отметить, что добавление NAC изменяет эффект только комплекса **2.2e**, не влияя на свойства цисплатина и СССР (рис. 2.22).

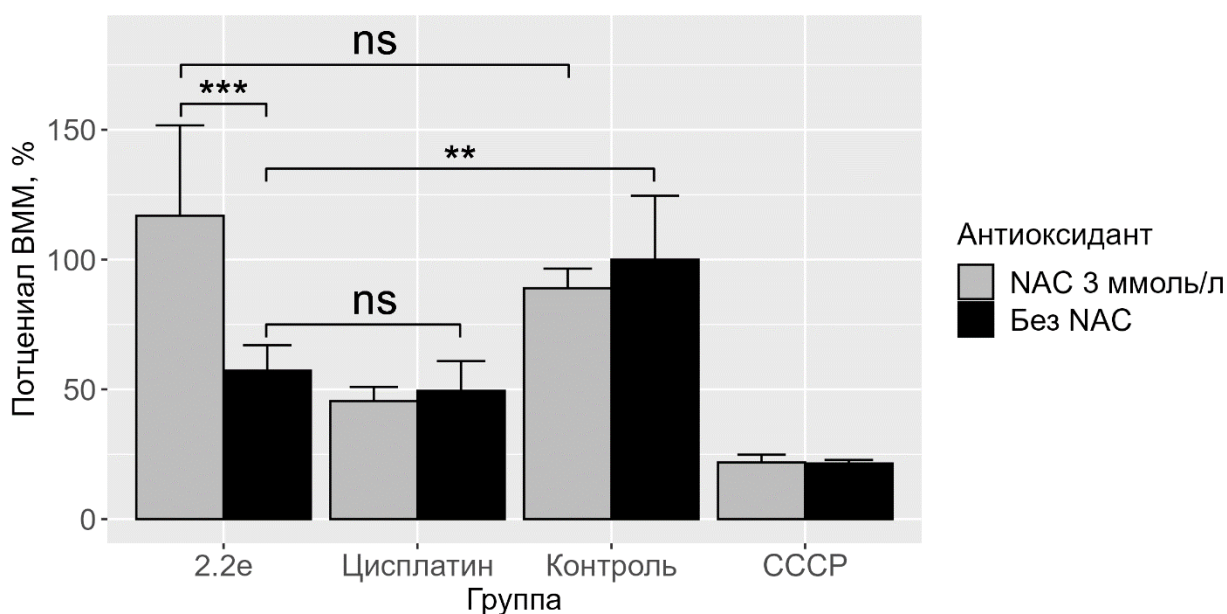


Рисунок 2.21 – Исследование влияния **2.2e** на потенциал ВММ клеток глиобластомы линии A172 в присутствии антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина (NAC): отношение красного и зеленого флуоресцентного излучения, $M \pm SD$ (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ^{ns} $p > 0,05$). За 100 % принято соотношение, полученное на интактных клетках в отсутствие NAC, $n = 4$

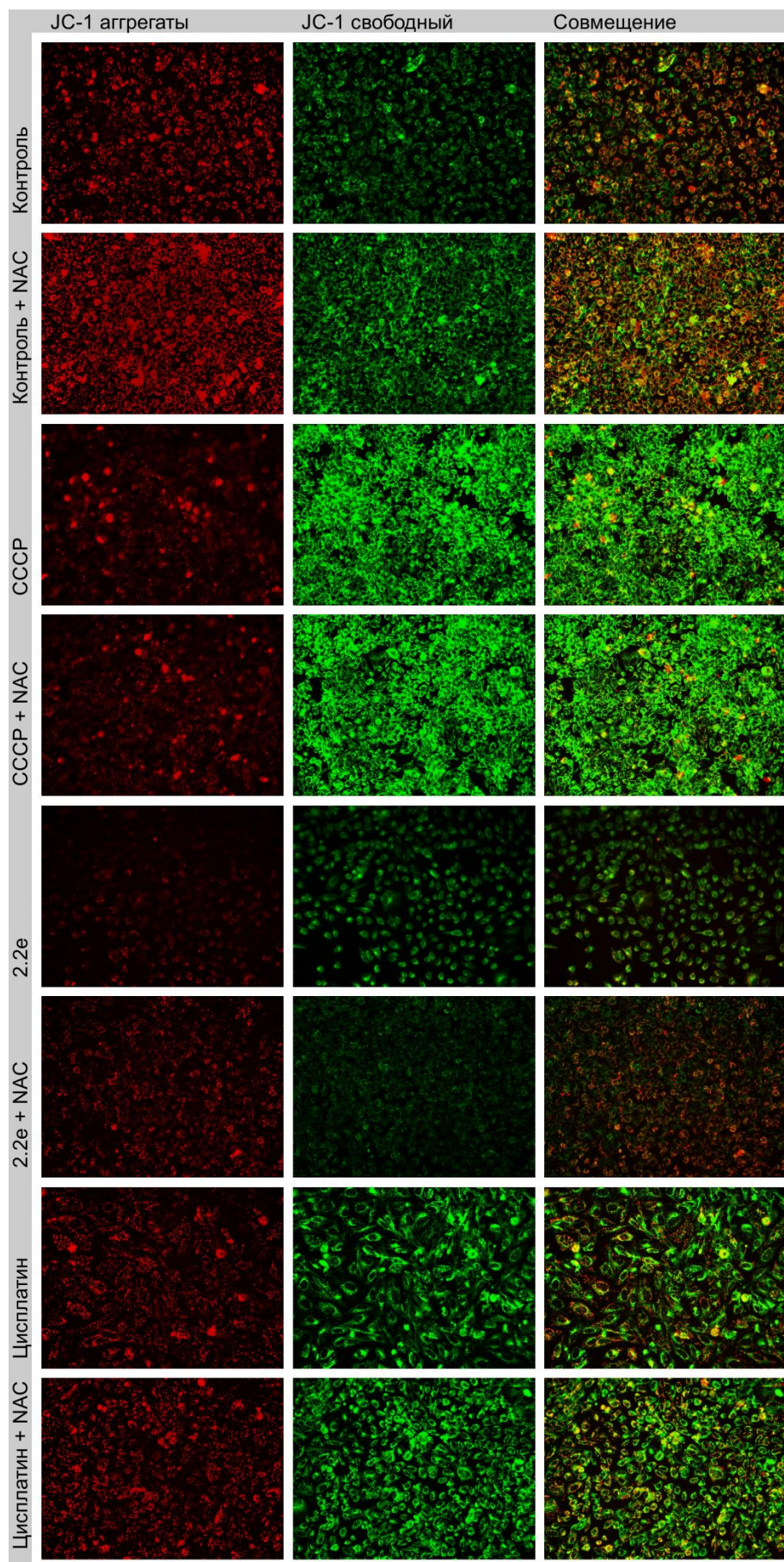


Рисунок 2.22 – Окрашивание клеток линии A172 красителем JC-1. Увеличение 200х

Важно отметить, что введение NAC блокировало процесс выработки АФК в клетках глиобластомы A172 под влиянием **2.2e**, что видно из результатов окрашивания. Для сравнения, цисплатин демонстрировал умеренную индукцию АФК в клетках данной линии, которая лишь частично снижалась в присутствии NAC (рис. 2.23).

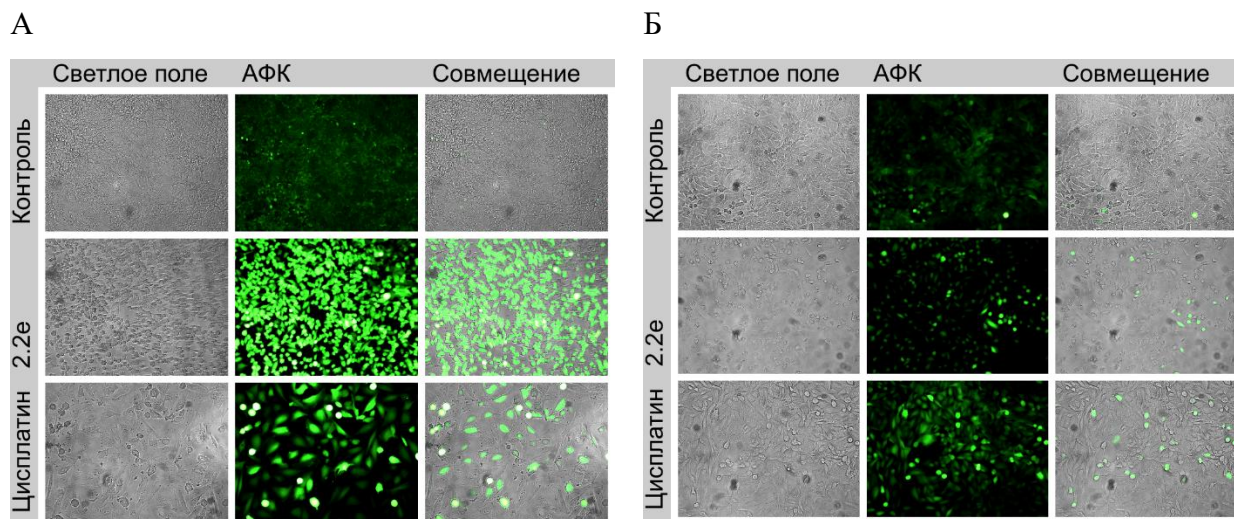


Рисунок 2.23 – Результат окрашивания клеток линий A172 красителем H₂DCFDA (2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина диацетат) в концентрации 10 мкмоль/л после 72-часовой инкубации с **2.2e** и цисплатином: А – без NAC; Б – с NAC 3 ммоль/л. Увеличение 200х

Таким образом, совокупность полученных данных подтверждает, что механизм действия соединения **2.2e** реализуется через индукцию окислительного стресса, опосредованного блокадой глутатионовой системы защиты клеток глиобластомы [100].

2.1.5. Выводы по комплексам платины (II)

Таким образом, определённое по результатам МТТ-теста соединение-лидер **2.2e** индуцирует гибель опухолевых клеток по механизму, отличному от цисплатина (образование сшивок с ДНК и апоптоз). Изучаемый комплекс платины (II) блокирует глутатион, являющийся центральным звеном в глутатионовой антиоксидантной системе защиты клетки, в результате чего происходит неконтролируемая выработка АФК, приводящая к ПОЛ и смерти клеток по типу ферроптоза. Обработка клеточной культуры **2.2e** сопровождалась выраженными морфологическими изменениями, снижением потенциала ВММ и повышением экспрессии белков теплового шока. С одной стороны, известно, что общей характеристикой злокачественных опухолей является устойчивость к апоптозу, следовательно, индукция неапоптотически регулируемой клеточной гибели может стать новой стратегией лечения, что делает **2.2e** перспективным соединением. С другой стороны, устойчивость к терапии во многом может быть обусловлена повышенной активностью глутатиона [40, 50–55], тем самым нацеливание на антиоксидантную систему NRF2/GSH может являться перспективной

терапевтической стратегией для борьбы с химиорезистентностью уже существующих препаратов, в том числе с помощью создания комбинированных схем лечения. Таким образом, **2.2e** представляет собой перспективную молекулу, индуцирующую гибель клеток ЗНО по пути ферроптоза, чего ранее для комплексов Pt(II) не было описано в литературе. Однако конструирование на основе **2.2e** комплекса Pt(IV) потенциально может привести к созданию пролекарства, сохраняющего неапоптотический способ индукции гибели клеток и обладающего преимуществами пролекарства. В отличие от Pt(II), комплексы Pt(IV) обладают более высокой стабильностью в кровотоке, что снижает системную токсичность и побочные эффекты (нефротоксичность, нейротоксичность). Кроме того, Pt(IV) выступает в роли пролекарства, активируясь преимущественно в восстановительной среде опухолевых клеток, что повышает селективность действия. Такая избирательность также позволяет частично преодолевать приобретенную резистентность, с которой часто сталкиваются препараты Pt(II). Более высокая стабильность комплексов Pt(IV) открывает возможность для их перорального применения, а наличие дополнительных позиций для функционализации дает возможность создавать комбинированные препараты с таргетными свойствами [42, 43].

Таким образом, на основе ранее разработанного комплекса платины(II), продемонстрировавшего высокую противоопухолевую эффективность, было принято решение создать его аналог в степени окисления платины(IV). Данная модификация направлена на снижение системной токсичности, обеспечение пролонгированного действия и расширение возможностей для дальнейшей функционализации молекулы.

2.2. Синтез потенциального пролекарства – комплекса платины (IV)

Схема синтеза комплекса платины(IV) представлена на схеме 2.2. Платиновый комплекс **2.2e** (0,15 ммоль) растворяли в ДМСО (3 мл) при комнатной температуре, после чего медленно добавляли HCl до образования осадка. Реакционную массу выдерживали при нагревании (60 °C) и перемешивании в течении 3 часов, затем добавляли воду (20 мл), образовавшийся желтый осадок отфильтровывали и промывали метанолом (5 мл).

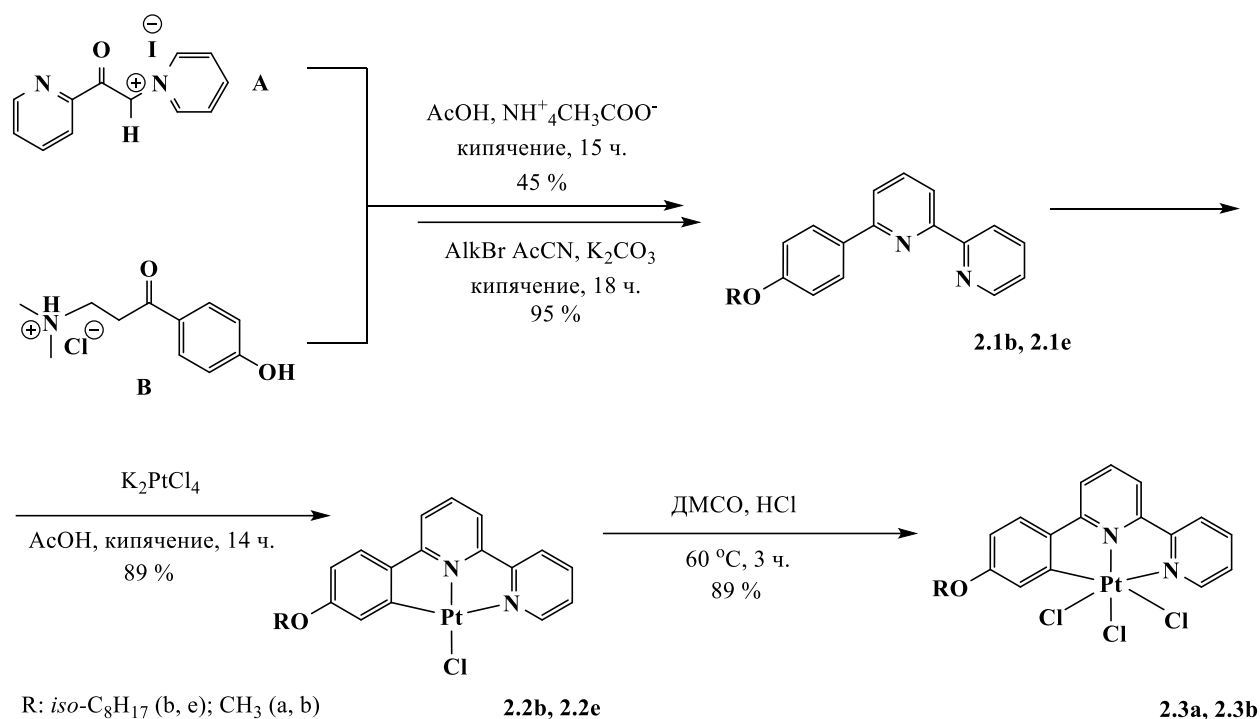


Схема 2.2 – Схема синтеза комплексов платины(IV) **2.3a-b**

Для комплекса **2.3b**, синтезированного на основе соединения-лидера **2.2e**, была осуществлена попытка проведения рентгеноструктурного анализа (РСА), однако качество дифракционных данных полученного кристалла было ограничено из-за высокой подвижности алкильного фрагмента. С целью структурного подтверждения и проверки методики, был выполнен синтез комплекса платины(IV) **2.3a** на основе соединения **2.2b**, отличающегося наличием более короткого метильного заместителя. Согласно данным рентгенографии, соединение кристаллизуется с молекулой CHCl_3 в centrosymmetric пространственной группе моноклинной системы с образованием оранжевых призматических кристаллов. Общая геометрия молекул показана на рис. 2.24. Атом Pt имеет искаженную октаэдрическую конфигурацию (табл. 2.11). В координационном многограннике связи Pt-Cl в пределах измерений равны, углы Cl-Pt-Cl близки к 90° . Искажения многогранника в основном связаны с геометрией координации гетероциклического лиганда. В кристалле наблюдаются укороченные контакты Cl...H-C_{ar} для атомов C(9), C(6) и C(4). Эти контакты, вероятно, отражают высокую кислотность C-H, обусловленную электроноакцепторными эффектами N-атомов в гетероцикле. π -Система атомов C(9), C(10), C(17) и C(16) образует укороченное π - π -взаимодействие с ближайшей молекулой [1-x, -y, 1-z] с межатомными расстояниями приблизительно 3,39 Å. Молекула CHCl_3 образует слабую водородную связь типа C-H...Cl с атомами Cl координационного многогранника для стабилизации молекулы в кристаллической структуре.

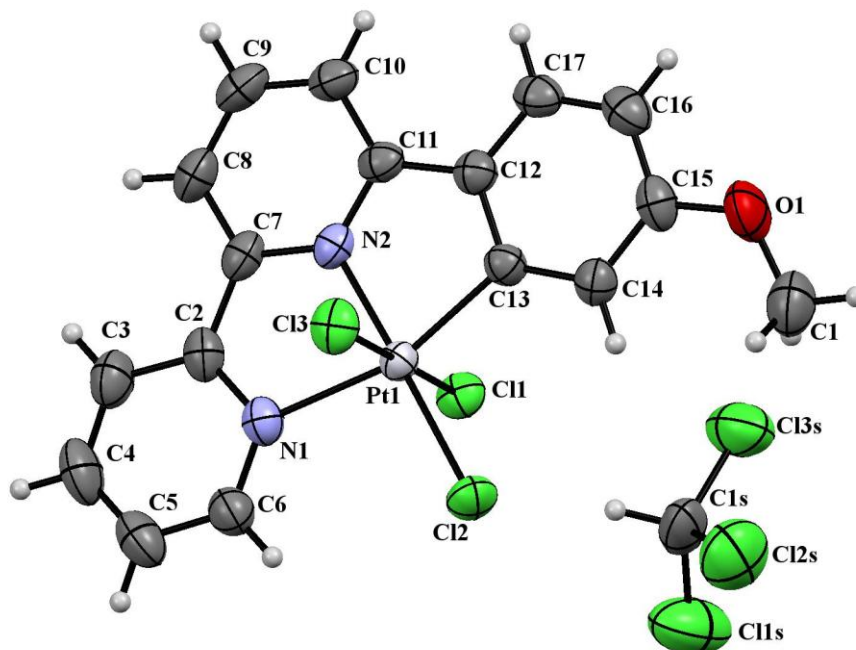


Рисунок 2.24 – Структура соединения **2.3a** в тепловых эллипсоидах с 50%-ным уровнем вероятности

Таблица 2.11 – Длины связей (Å) и валентные углы (°) в структуре соединения **2.3a**

Связь	Å	Угол	°	Угол	°
Pt1Cl1	2.3b169(12)	Cl1Pt1Cl3	179.14(4)	N1Pt1N2	79.17(15)
Pt1Cl2	2.3b130(12)	Cl2Pt1Cl3	91.16(5)	N1Pt1Cl1	89.71(11)
Pt1Cl3	2.3b186(12)	Cl2Pt1Cl1	89.39(5)	N1Pt1Cl2	99.33(11)
Pt1N1	2.156(4)	N2Pt1Cl1	91.10(11)	N1Pt1Cl3	89.55(11)
Pt1N2	1.973(4)	N2Pt1Cl2	178.42(10)	C13Pt1N2	82.00(17)
Pt1C13	2.029(4)	N2Pt1Cl3	88.33(11)	C13Pt1N1	161.17(17)

Доказательство строения синтезированных соединений проводили также с использованием данных элементного анализа, спектроскопии ИК и ЯМР, включая одномерные спектры на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{195}Pt , а также двумерные эксперименты 2D ^1H - ^{13}C gHMBC, 2D ^1H - ^{15}N gHMBC и 2D ^1H - ^{195}Pt gHMBC. Использование комплекса спектральных данных позволило выполнить однозначное отнесение сигналов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C для всех соединений.

2.2.1. Изучение цитотоксичности платины (IV) *in vitro*

Комплекс **2.3b** обладал достаточной растворимостью для проведения экспериментов и по результатам МТТ-теста были рассчитаны индексы цитотоксичности (IC_{50}), представленные в таблице 2.12. Из таблицы 2.12 следует, что комплекс платины (IV) не только в разы превосходит по активности свой предшественник **2.2e**, но также обладает значительно большей

эффективностью в сравнении с положительным контролем, в качестве которого использовался цисплатин.

Таблица 2.12 – Индекс цитотоксичности (IC_{50}) $\pm$ стандартная ошибка (SE) **2.2e** и **2.3bb** на клетках почки эмбриона человека (HEK293), глиобластомы (A172), карциномы легкого (A549) и карциномы печени (HepG2) человека, мкмоль/л

Соединение	Клеточная линия				Валентность Pt
	HEK293	A172	A549	HepG2	
Цисплатин	19,52 $\pm$ 2,93	4,20 $\pm$ 0,53	24,42 $\pm$ 5,40	32,23 $\pm$ 5,25	II
2.2e	31,69 $\pm$ 3,43	8,18 $\pm$ 1,51	11,40 $\pm$ 1,41	24,19 $\pm$ 1,93	II
2.3b	2,91 $\pm$ 0,47	0,27 $\pm$ 0,05	7,35 $\pm$ 0,68	2,63 $\pm$ 0,59	IV

Полученные данные свидетельствуют об успешном изменении структуры соединения-лидера и синтезе комплекса платины(IV), которая привела к повышению активности в несколько раз.

Наибольший эффект **2.3b** оказывает на клетки глиобластомы A172, что согласуется с данными, полученными на его предшественнике **2.2e**, который также в большей степени проявлял активность против данной клеточной линии, однако необходимо обозначить, что активность **2.3b** в данном случае была в 30 раз сильнее. Интересно отметить, что линия A549 оказалась менее восприимчива к действию **2.3b** и эффект на ней был сопоставим с эффектом, полученным от комплекса платины(II) **2.2e**. Карцинома печени HepG2, в свою очередь, ингибировалась комплексом платины(IV) в 9 раз эффективней, чем комплексом платины(II).

Значимым результатом являются данные, полученные по итогам расчета индекса селективности (табл. 2.13). Так, SI для комплекса **2.3b** на линии A172 превышает 10,5, что говорит о высоком потенциале данного вещества в качестве ингибитора клеточной жизнеспособности данной нозологии. Интересно отметить, что клетки глиогенных опухолей (в том числе глиобластомы) характеризуются повышенной активностью антиоксидантных систем, включая глутатион-зависимую, что рассматривается как фактор устойчивости к химиотерапии [134] и потенциально может объяснять повышенную активность комплексов в отношении A172, так как глутатион в данном случае является основной внутриклеточной мишенью.

Таблица 2.13 – Коэффициент селективности (SI) **2.2e** и **2.3b** в отношении клеток глиобластомы (A172), карциномы легкого (A549) и карциномы печени (HepG2) человека

Соединение	Клеточная линия		
	A549	HepG2	A172
2.2e	2,8	1,3	3,9
2.3b	0,4	1,1	10,8

Расчетные значения индекса селективности и данные цитотоксичности позволяют сделать предварительный вывод об успешной модификации вещества и создании более активного, селективного и эффективного соединения.

2.2.2. Подтверждение мишени и механизма действия комплекса платины (IV)

2.2.2.1. Антиоксидантная система NRF2/GSH

Для верификации сохранения механизма действия оптимизированного комплекса платины (IV) был проведен анализ ключевых маркеров ферроптоза, эффект на которые был определен под действием **2.2e**: NRF2, ACSL4 – таблица 2.14; GPX4 – таблица 2.15.

Таблица 2.14 – Изменение экспрессии NRF2 и ACSL4 в клетках глиобластомы после инкубации с соединением **2.3b**, $M \pm SD$, $n = 3$, % от отрицательного контроля

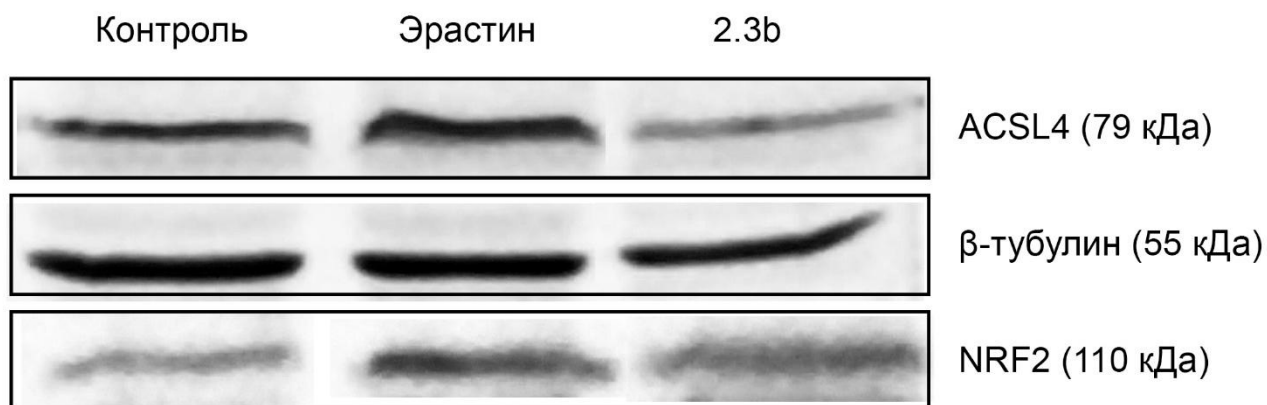
№	Соединение	Маркер/белок	
		ASCL4	NRF2
1	2.3b	98,2 $\pm$ 1,54	229,0 $\pm$ 44,4
2	Эрастин	130,0 $\pm$ 3,1	246,0 $\pm$ 47,9
3	Контроль	100,0 $\pm$ 2,13	100,0 $\pm$ 21,0

1. NRF2. В результате проведения вестерн-блоттинга установлено, что **2.3b** активирует редокс-чувствительный транскрипционный фактор NRF2, повышая его экспрессию в 2,3 раза в сравнении с отрицательным контролем ($p < 0,01$). Эрастин, использовавшийся в качестве положительного контроля, приводит к сопоставимому увеличению активности NRF2 – в 2,5 раза – рис. 2.25. Сохраняя механизм активации белка, Pt(IV) обеспечивает более устойчивый и мягкий фармакологический ответ (2,3-кратная активация), позволяя снизить риск токсического воздействия, связанного с высокой и резкой стимуляцией ответа (5-кратная активация для **2.2e**).

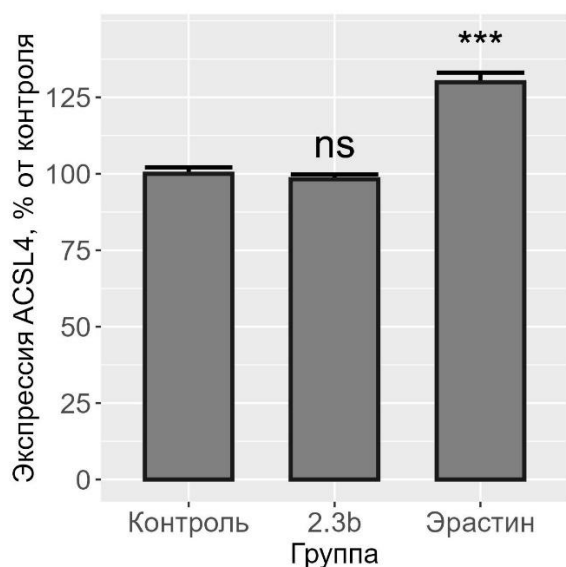
2. ACSL4. Обработка эрастином приводила к небольшому, но статистически значимому повышению экспрессии ACSL4 (1,3 от контроля; $p < 0,001$). Этот умеренный, но

достоверный рост указывает на то, что клетки сохраняют способность реагировать на классический индуктор ферроптоза, и ферментативный аппарат для генерации субстратов перекисного окисления остается функционально активным. В отличие от эрастина, соединение **2.3b** не вызывало статистически значимых изменений экспрессии ACSL4 (0,98 от контроля; $p > 0,05$), что свидетельствует о том, что необходимый субстрат для ПОЛ в клетках присутствует – рис. 2.25.

А



Б



В

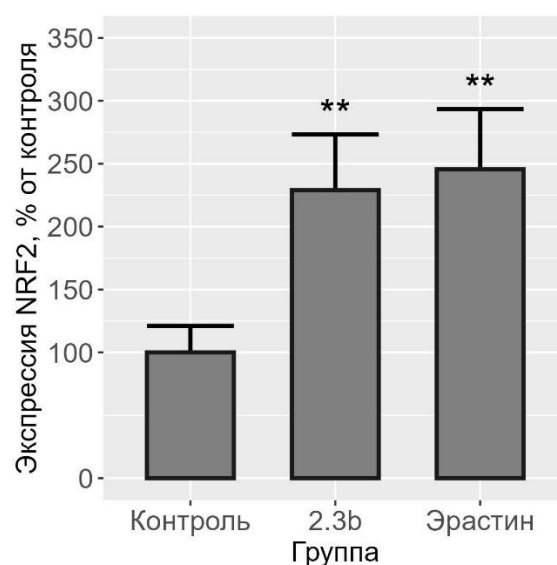


Рисунок 2.25 – Анализ экспрессии ACSL4 и NRF2 в клетках глиобластомы A172 под влиянием **2.3b**: А – бэнды белковых полосок; Б, В – столбчатые диаграммы, отражающие изменение активности ACSL4 и NRF2 соответственно в сравнении с интактным контролем, принятым за 100 %, $n = 3$, (ns – без статистически значимых отличий; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$)

Для оценки динамики и пролонгированности действия соединения **2.3b** было принято решение изучить его влияние на GPX4 в нескольких режимах: двухчасовая инкубация в десятикратных концентрациях (аналогично условиям с **2.2e**) позволит оценить первичные

эффекты вещества на клетки; 24-часовая инкубация в концентрации IC_{50} покажет, возникает ли эффект спустя непродолжительное время, то есть начинает ли вещество действовать уже на этом этапе; а 72-часовая инкубация в IC_{50} даст возможность оценить накопленный эффект.

Таблица 2.15 – Изменение активности GPX4 в клетках глиобластомы после инкубации с соединением **2.3b**, $M \pm SD$, $n = 3$, % от отрицательного контроля

№	Соединение	Маркер/белок		
		GPX4 2 часа	GPX4 24 часа	GPX4 72 часа
1	2.3b	65,1 $\pm$ 23,2	71,6 $\pm$ 18,9	33,2 $\pm$ 0,92
2	Эрастин	8,46 $\pm$ 4,32	65,12 $\pm$ 12,5	16,2 $\pm$ 1,85
3	Контроль	100,0 $\pm$ 12,2	100,0 $\pm$ 1,61	100,0 $\pm$ 2,9

2 часа: инкубации с десятикратными концентрациями веществ ($\times 10$ IC_{50} для **2.2** и 100 мкмоль/л для эрастина; 24 часа: инкубация с **2.3b** в IC_{50} , с эрастином в 10 мкмоль/л; 72 часа: инкубация с **2.3b** в IC_{50} , с эрастином в 2 мкмоль/л

3. GPX4. Уровень глутатионпероксидазы 4 в клетках глиобластомы после добавления к ним десятикратной концентрации IC_{50} вещества **2.3b** снижался до 0,65, аналогичный эффект наблюдался при 24-часовой инкубации в IC_{50} . Это говорит о том, что повышение концентрации и сокращение времени выдержки для изучения эффектов в данном случае является неэффективным и подтверждает накопительный механизм **2.3b**. 72-часовая инкубация же приводила к существенным изменениям количества GPX4, его активность снижалась до 0,3 единиц от отрицательного контроля ($p < 0,001$), это подтверждает пролонгированный эффект и статус пролекарства, которому для превращения из неактивного вещества в активное требуется время (т.е. для активации необходимо восстановление, которое происходит внутри опухолевой клетки). Так, двух часов недостаточно и, несмотря на увеличение концентрации в 10 раз, соединение не успевает претерпеть трансформацию, необходимую для осуществления своего механизма. Увеличение времени выдержки в данном случае позволяет отследить динамику и подтвердить механизм противоопухолевого действия **2.3b**, который связан с блокадой глутатиона и антиоксидантной системы NRF2/GSH, однако, в отличие от **2.2e**, эти влияния имеют накопительный и пролонгированный эффект – рис. 2.26.

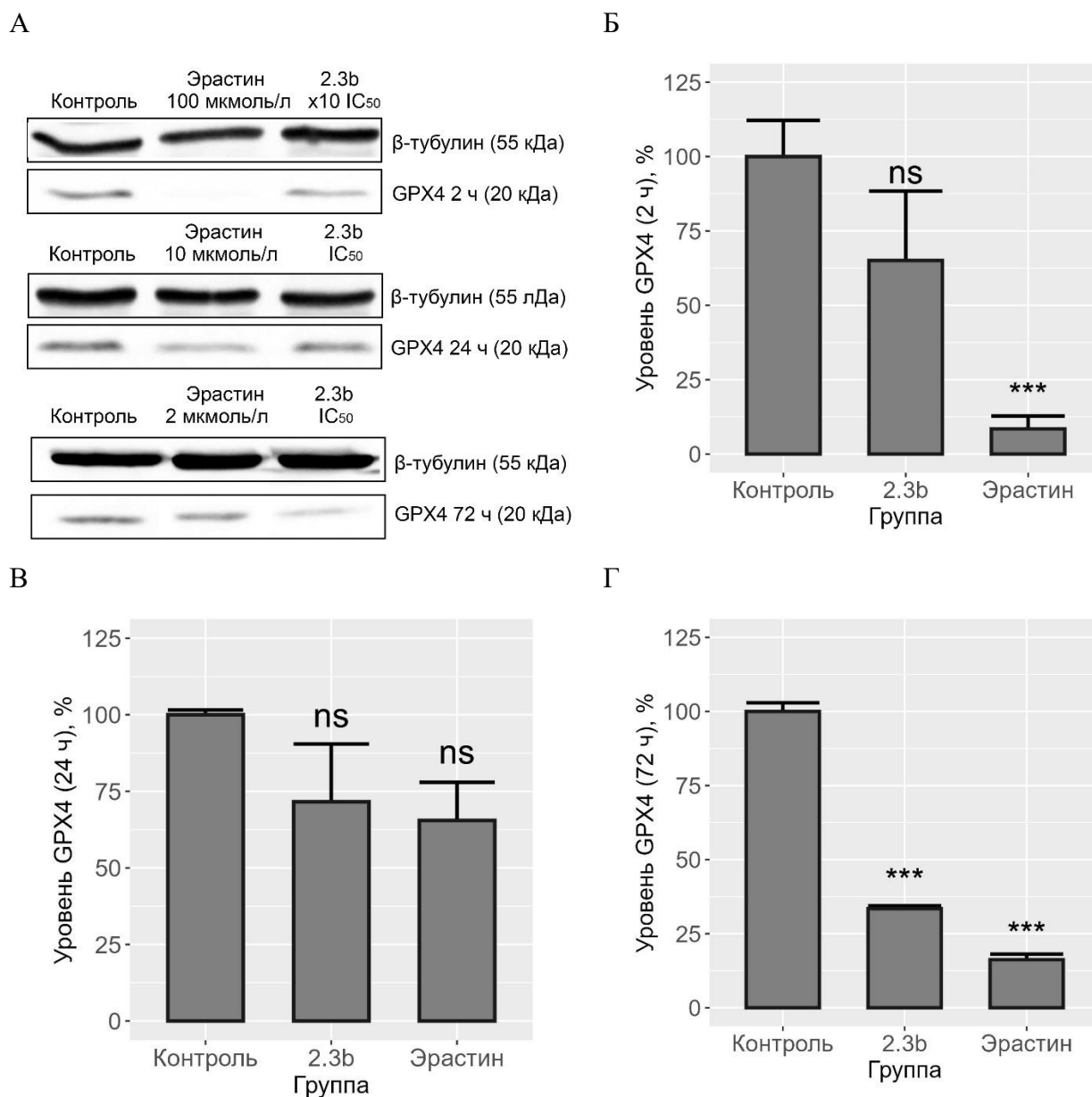


Рисунок 2.26 – Анализ экспрессии GPX4 в клетках глиобластомы A172 под действием **2.3b**: А – бэнды белковых полосок, полученные в результате 24-часовой, 2-часовой инкубации в повышенных концентрациях и 72-часовой инкубации глиобластомы A172 соответственно с **2.3b** и эрастином; Б, В, Г – столбчатые диаграммы, отражающие изменение активности GPX4 в динамике (отрицательный контроль принят за 100 %), $n = 3$, (ns – без статистически значимых отличий; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Дополнительный анализ экспрессии на уровне мРНК позволил выявить статистически значимое снижение активности *GPX4* (до 0,34) и повышение *ACSL4* (до 2,82) относительно отрицательного контроля ($p < 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно) под влиянием комплекса платины (IV) **2.3b**. Полученный результат отличается от данных по влиянию на экспрессию *GPX4* комплекса **2.2e**, под действием которого не происходило статистически значимых изменений его

активности, что может свидетельствовать о том, что **2.2e** способствует пост-транскрипционному истощению фермента. Предполагается, что **2.3b** также, как и **2.2e**, блокирует GSH, что, как следствие, приводит к деградации непосредственно фермента GPX4, для которого GSH служит необходимым кофактором. Одновременно с этим, имеющиеся литературные данные указывают на то, что истощение глутатиона не способствует изменению экспрессии гена *GPX4*, что подтверждается, например, 24-часовым воздействием эрастина, при котором не было статистически значимых изменений ($p > 0,05$). Однако под влиянием **2.3b** и эрастина (72 часа) наблюдалась иная картина: определено статистически значимое снижение уровня мРНК *GPX4*, что, предположительно, может быть связано с механизмами отсроченной обратной связи внутриклеточных регуляторных систем, например, за счет вовлечения транскрипционных факторов, активность которых зависит от изменений уровня оксигенации и АФК [135]. Значительный рост мРНК *ACSL4* для всех проб ($p < 0,01$) отражает попытку модулировать липидный состав мембран в ответ на хронический редокс-дисбаланс, что согласуется с данными о механизмах ферроптоза (рис. 2.27) [136, 137].

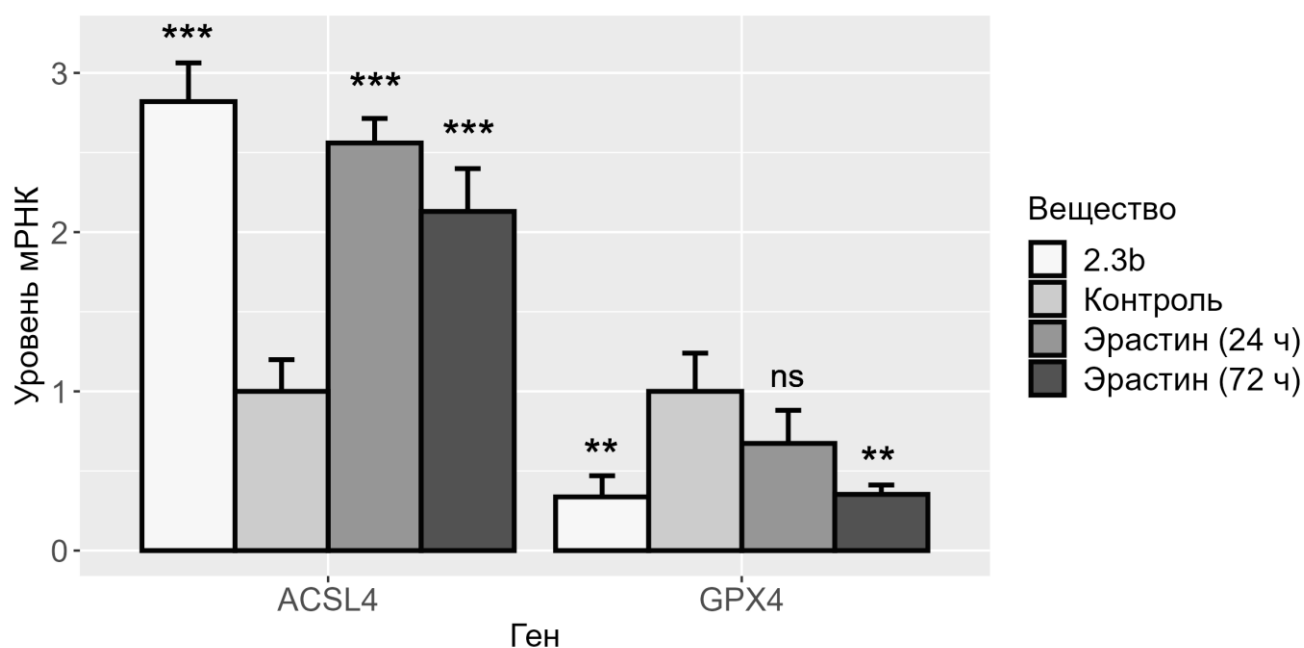


Рисунок 2.27 – Анализ экспрессии маркеров ферроптоза в клетках глиобластомы A172 после воздействия **2.3b** методом ПЦР в реальном времени, $n = 3$ (ns – без статистически значимых отличий; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

2.2.2.2. Реакция с глутатионом

Для комплекса **2.3b** был проведен аналогичный **2.2e** эксперимент по оценке его способности связывать глутатион. К 5 мкмоль комплекса Pt(IV) в ДМСО-d6 добавляли 5,2

мкмоль GHS. Реакция протекает по аналогичному **2.2e** пути, о чем говорит смещение протонов CH_2 при SH группе (dd 2.80 м.д, 2.66 м.д) в слабое поле (dd 3.06 м.д, 2.88 м.д), однако образование интермедиатов с сигналами при 9.08, 9.15 м.д. вероятно затруднено, что объясняет низкую интегральную интенсивность сигналов, а также большее время установления равновесия с продуктом, протон $6'$ которого проявляется при 9.25 м.д., увеличившееся до 15048 секунд. Однако в данном случае реакция не протекает до конца, остаток исходного реагента в реакционной массе составляет 62,5 %. Полученные данные говорят о меньшей реакционной способности комплексов Pt(IV) с GHS (рис. 2.28).

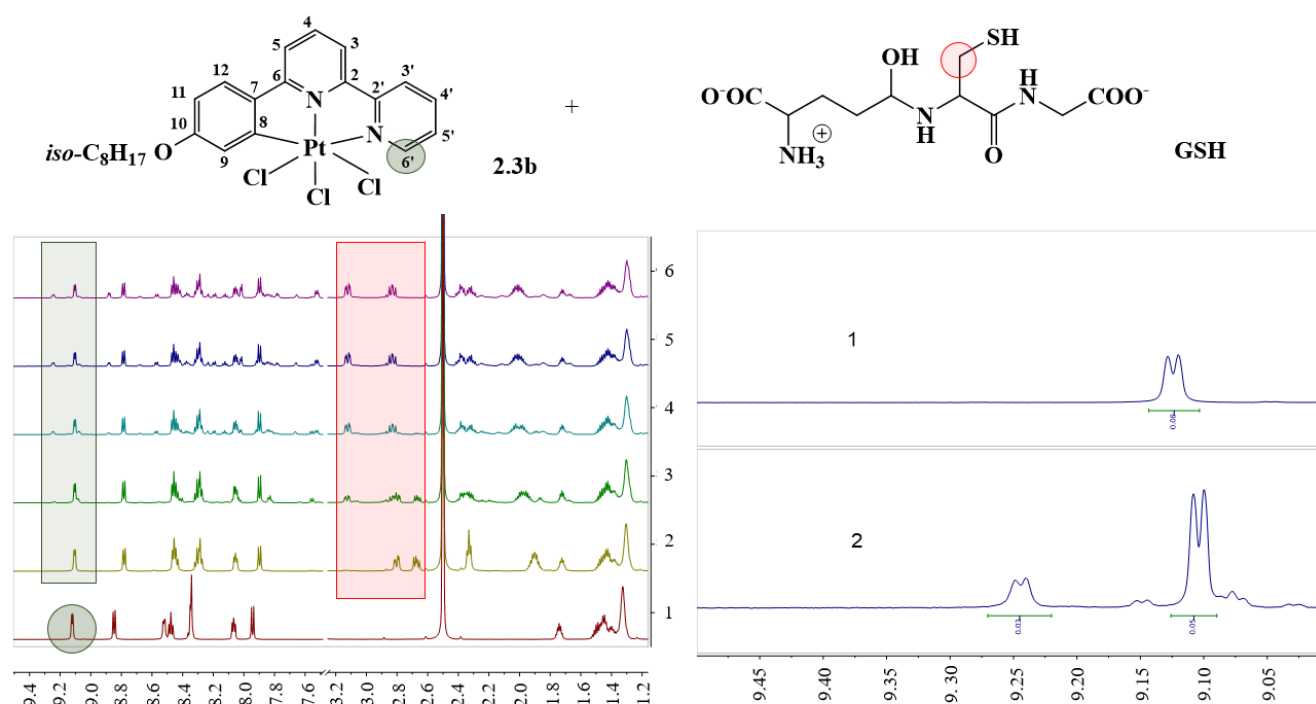


Рисунок 2.28 – Фрагменты ^1H ЯМР спектра: слева – 1) Pt(IV) комплекса **2.3b** 2) РМ после 214 секунд с начала реакции 3) РМ после 1926 секунд с начала реакции 4) РМ после 5136 секунд с начала реакции 5) РМ после 10486 секунд с начала реакции 6) РМ после 14766 секунд с начала реакции; справа – 1) комплекса **2.3b** 2) РМ после 15048 секунд с начала реакции. За 1 принята относительная интегральная интенсивность остаточного пика ДМСО- d_6 (δ_{H} 2.50 м.д.)

Также был проведён эксперимент в $\text{DMF-}d_7$. К 6,9 мкмоль комплекса платины добавляли 6,8 мкмоль GHS. В данном случае ход реакции значительно отличался. В первые 5136 секунд превращение шло по описанному ранее пути, с образованием продукта, сигнал протона $9'$ которого проявляется при 9.54 м.д. Однако далее интенсивность сигнала падает, с одновременным проявлением дублета при 9.02. Данный факт говорит о восстановлении комплекса Pt(IV) **2.3b** до исходного комплекса Pt(II) **2.2e** глутатионом, и подтверждается сравнением спектров веществ, представленном на рис 2.29.

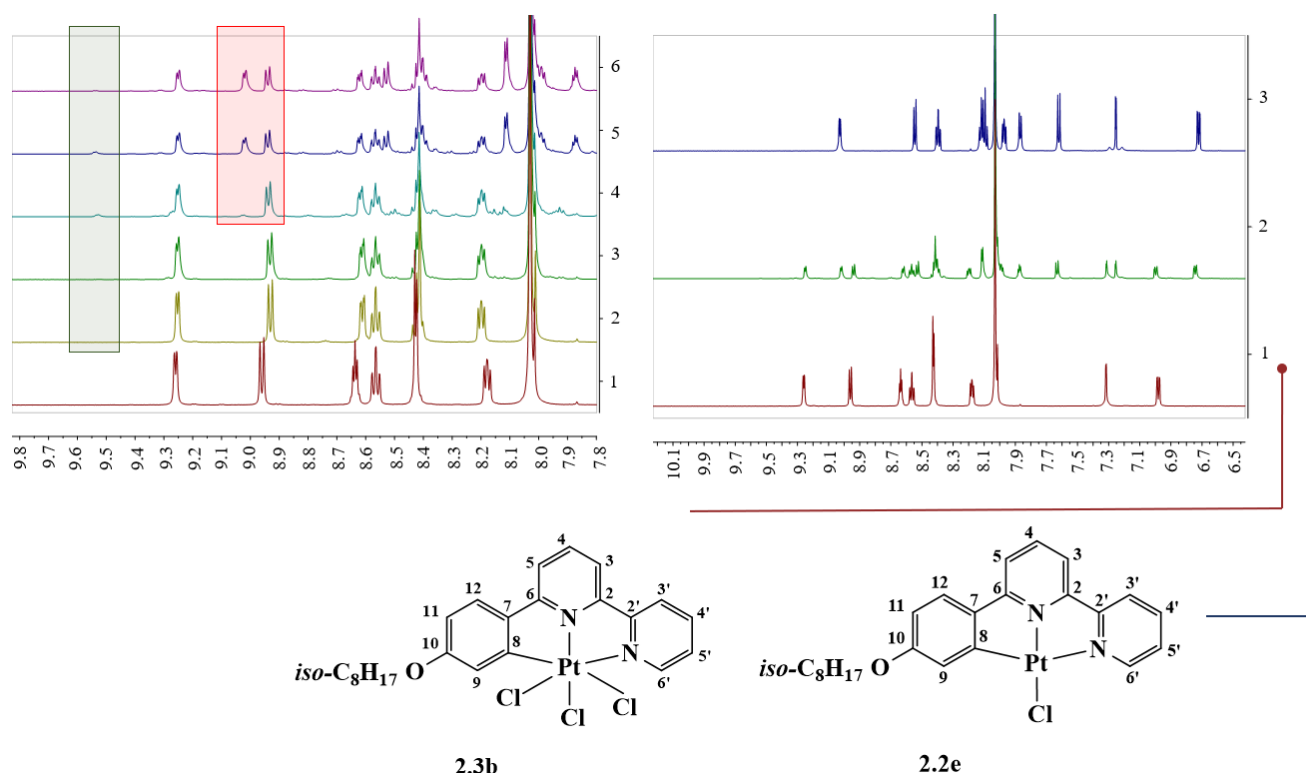


Рисунок 2.29 – Фрагменты ^1H ЯМР спектра: слева – 1) Pt(IV) комплекса **2.3b** 2) РМ после 214 секунд с начала реакции 3) РМ после 1926 секунд с начала реакции 4) РМ после 5136 секунд с начала реакции 5) РМ после 10486 секунд с начала реакции 6) РМ после 14766 секунд с начала реакции; справа – 1) Pt(II) комплекса **2.3b** 2) РМ после 15194 секунд с начала реакции 3) Pt(IV) комплекса **2.2e**

По итогам исследования можно сделать вывод о способности комплексов Pt(II) 6-арил-2,2'-бипиридинов с хлорными лигандами к взаимодействию с глутатионом с образованием S-Pt комплексов. При этом, для комплексов Pt(II) реакция идет с большей скоростью, чем для соответствующих соединений Pt(IV).

Однако, важно отметить, что наблюдаемая скорость реакции обусловлена логичным внутриклеточным механизмом: восстановление Pt(IV) до Pt(II) идет с помощью глутатиона (GSH), что подтвердилось с помощью ЯМР спектроскопии, тогда как GSH переходит в окисленную форму – глутатиондисульфид GSSG, который под действием глутатионредуктаз (GR) в клетках восстанавливается обратно до GSH [138]. Окисленная форма GSSG не вступает в реакцию с образовавшимся комплексом платины(II), а восстановленный GSH блокируется ей. Таким образом, введение комплекса платины(IV) в данном случае имеет пролонгированный и усиленный эффект, так как, с одной стороны, идет расходование глутатиона на то, чтобы восстановить комплексы платины(IV) до платины(II), а, с другой стороны, оставшийся и

восстановленный глутатионредуктазами глутатион блокируются Pt(II). Предполагаемый механизм протеканий реакции представлен на схеме 2.3.

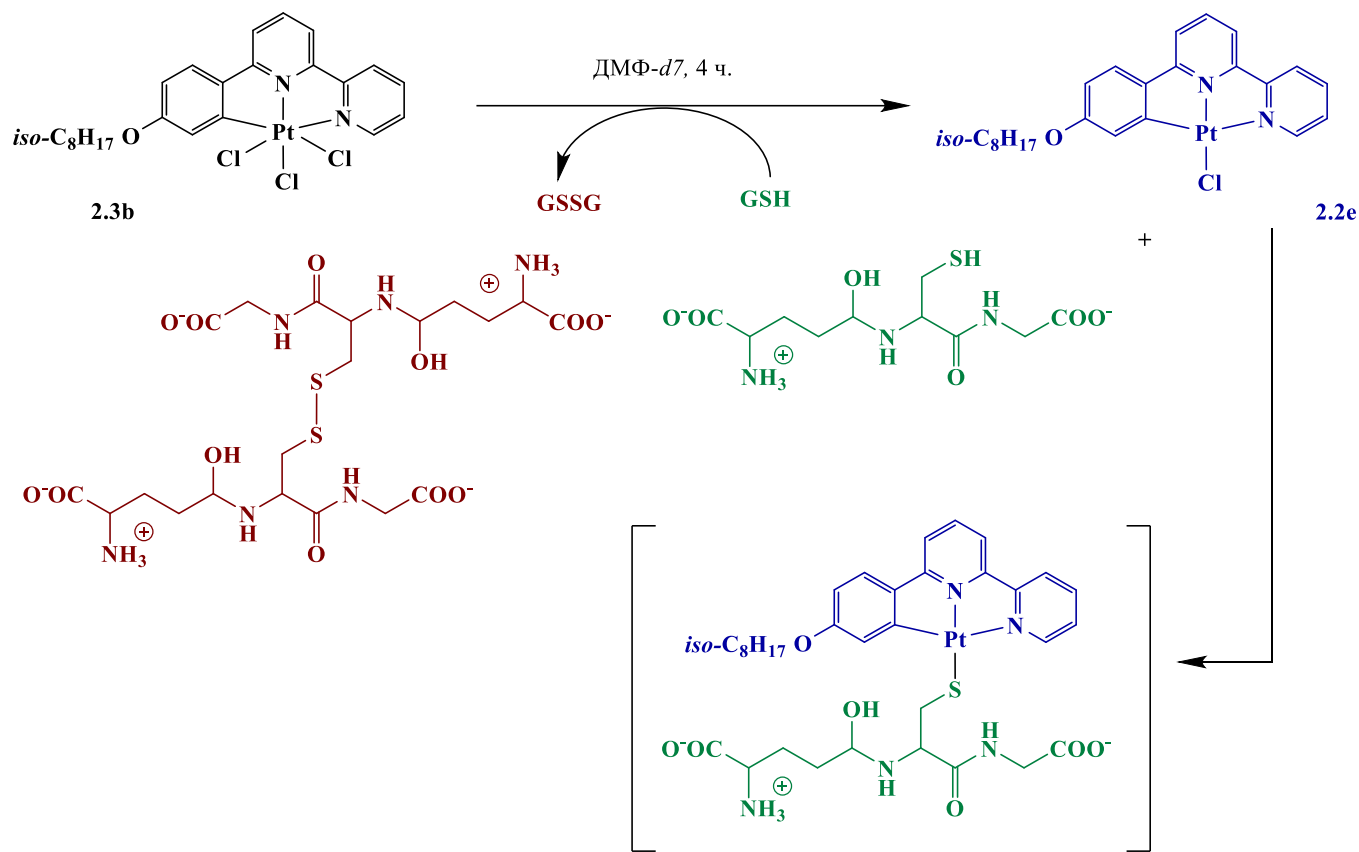


Схема 2.3 – Предполагаемая схема превращений комплекса платины(IV) **2.3b** в присутствии глутатиона (GSH) в **2.2e** с последующей блокировкой GSH

Таким образом, мишень и механизм действия для оптимизированного комплекса платины(IV) **2.3b** сохранены, однако в данном случае наблюдается несколько иная картина, связанная с накопительным и пролонгированным действием **2.3b**. Так, комплекс Pt(II) **2.2e** сразу же представляет собой активную молекулу, которая нацеливается на клеточную мишень и проявляет свои эффекты в первые часы добавления к культуре, комплексы Pt(IV) же необходимо восстановление, на которое затрачивается некоторое время. И, поскольку восстановление платины протекает постепенно и растянуто во времени, ожидается, что высвобождение активной формы металлокомплекса в организме будет происходить не мгновенно, а в течение какого-то продолжительного периода. Это, в свою очередь, может обеспечить пролонгированное действие препарата, снижение токсических эффектов и избирательность.

2.2.3. Вовлечение апоптоза и дополнительные мишени

Учитывая значительное возрастание цитотоксической активности оптимизированного соединения по сравнению с исходным лидером, нельзя исключать вовлечение дополнительных механизмов гибели. Для проверки гипотезы о возможном двойном механизме действия

проведена оценка индукции апоптоза методом с Аннексин V-FITC/PI, а также анализ маркера апоптоза PARP1 методом вестерн-блоттинга.

1. Анализ транслокации фосфатидилсерина как маркера раннего апоптоза. В результате эксперимента с Аннексин V-FITC и PI было установлено, что комплекс **2.3b** индуцирует гибель более чем 74 % клеток в пробе, вызывая при этом разрушение цитоплазматической мембраны в 71 % случаев. При этом, 16 % клеток оказались АнV+/PI+, что говорит о позднем апоптозе или нарушении целостности ЦПМ, а более 55 % при этом были АнV–/PI+, что подтверждает в том числе неапоптотические механизмы индукции клеточной смерти. Лишь 3 % клеток оказались в раннем апоптозе (АнV+/PI–). Совершенно иная картина представлялась после обработки клеток цисплатином, который в большей степени индуцировал ранний апоптоз (49 % – АнV+/PI–), сопровождающийся менее выраженными познеапоптотическими изменениями клетки (26 % – АнV+/PI+). При этом нарушение целостности ЦПМ без транслокации фосфатидилсерина отмечалось значительно реже (4 % – АнV–/PI+). Исходя из полученных данных, можно сделать предположение, что **2.3b** является более мощным цитотоксическим агентом, после обработки которым клетки запускают не только ферроптотические механизмы гибели, но и апоптотические, причем при данном дизайне эксперимента обработка культуры A172 соединением **2.3b**, предположительно, приводит к переходу клеток преимущественно в поздний апоптоз – рис. 2.3b0. Однако данная гипотеза требует дальнейшей верификации с использованием вестерн-блоттинга на один из ключевых маркеров позднего апоптоза PARP1.

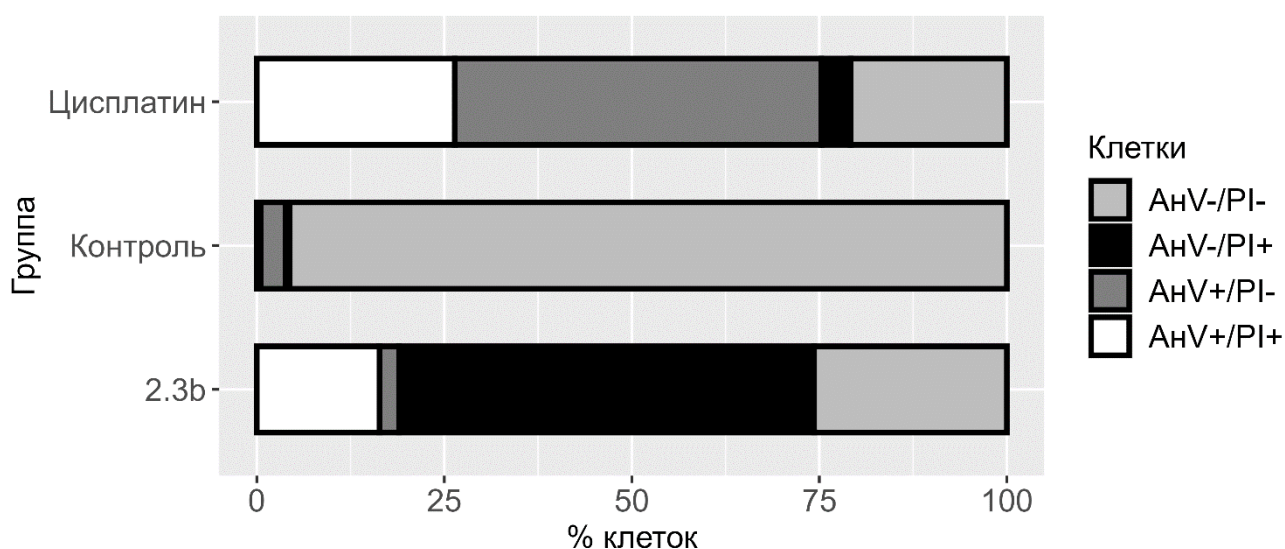


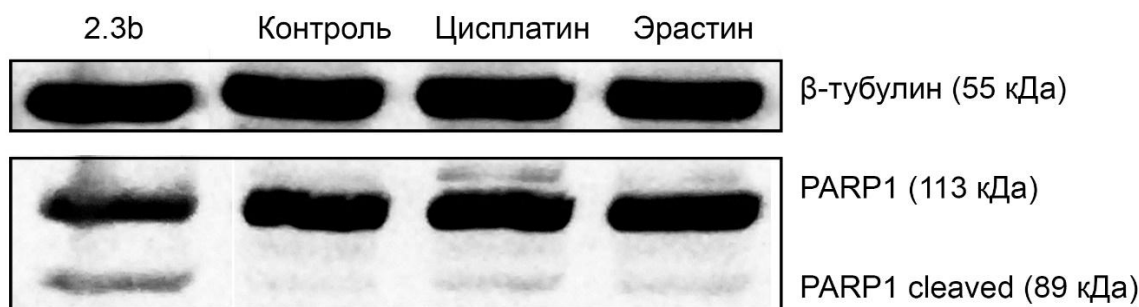
Рисунок 2.30 – Процент клеток линии A172, находящихся в раннем апоптозе (АнV+/PI–), позднем апоптозе (АнV+/PI+), погибших (АнV–/PI+) и живых (АнV–/PI–) после воздействия на них соединением **2.3b** в концентрации, равной IC₅₀, в течение 72 часов

2. PARP1 – это ядерный фермент, который играет ключевую роль в репарации ДНК. Во время апоптоза он становится одной из основных мишеней для каспаз, в частности, каспазы-3 и каспазы-7 [139]. При постановке вестерн-блоттинга на PARP1 в условиях апоптоза наблюдается расщепление полноразмерного белка массой 116 кДа (функционально активный PARP1) с образованием характерного фрагмента массой 89 кДа (специфичный продукт протеолиза каспазой-3), что визуально проявляется в появлении второго бэнда ниже основного при сохранении исходного (ранний апоптоз), либо в почти полном исчезновении верхнего бэнда и накоплении нижнего бэнда 89 кДа (поздний апоптоз) [140]. Результаты эксперимента по исследованию изменения распределения общего и расщепленного PARP1 представлены в табл. 2.16. Интересно отметить, что наблюдалось выраженное расщепление PARP1 под действием **2.3b**, причем эффект от комплекса был намного сильнее, чем от цисплатина или эрастина. Количество расщепленного каспазами PARP1 после воздействия на клетки A172 Pt(IV) в 3,6 раза превышало отрицательный контроль, в то время как обработка цисплатином и эрастином способствовала лишь 1,5 кратному увеличению (рис. 2.3b2).

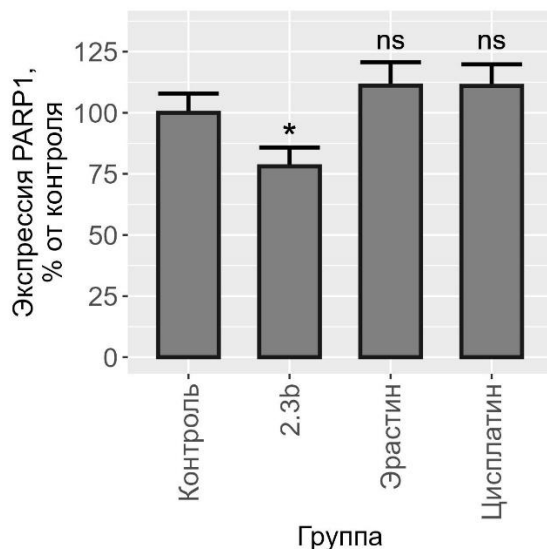
Таблица 2.16 – Изменение экспрессии PARP1 в клетках глиобластомы после инкубации с соединением **2.3b**, $M \pm SD$, $n = 3$, % от отрицательного контроля

№	Соединение	Маркер/белок	
		PARP1	PARP1 cleaved
1	2.3b	78,1 $\pm$ 7,64	367,0 $\pm$ 106,0
2	Эрастин	111,0 $\pm$ 9,62	152,0 $\pm$ 56,5
3	Контроль	100,0 $\pm$ 7,87	100,00 $\pm$ 44,4
4	Цисплатин	111,0 $\pm$ 9,62	155,0 $\pm$ 53,3

А



Б



В

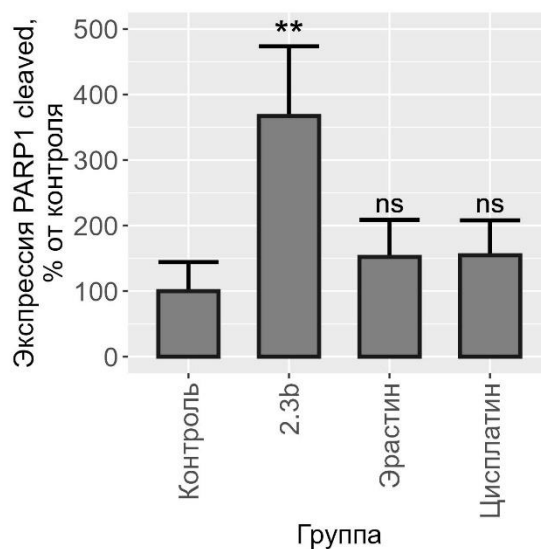


Рисунок 2.31 – Анализ экспрессии PARP1 в клетках глиобластомы A172 под действием **2.3b**: А – бэнды белковых полосок; Б, В – столбчатые диаграммы, отражающие изменения общего и расщепленного PARP1 (отрицательный контроль принят за 100 %), $n = 3$, (ns – без статистически значимых отличий; ** $p < 0,01$)

2.2.4. Выводы по комплексу платины(IV)

Таким образом, синтезированный на основе соединения-лидера комплекс платины(IV) сохранил установленный механизм и индуцировал ферроптоз в клетках ЗНО, однако, в данном случае, наблюдалось вовлечение дополнительных способов индукции клеточной смерти, таких, как апоптоз. При этом, установлено, что происходит восстановление Pt(IV) до Pt(II) посредством окисления глутатиона, за счет чего наблюдается пролонгированный эффект при меньших значениях цитотоксичности. Образовавшаяся платина(II), в свою очередь, блокирует глутатион, индуцируя ферроптоз, но, в отличие от использования сразу же двухвалентной платины, из-за более плавного истощения пула глутатиона в ответ на накопительную стресс-реакцию клетка дополнительно запускает и апоптоз (рис. 3.33).

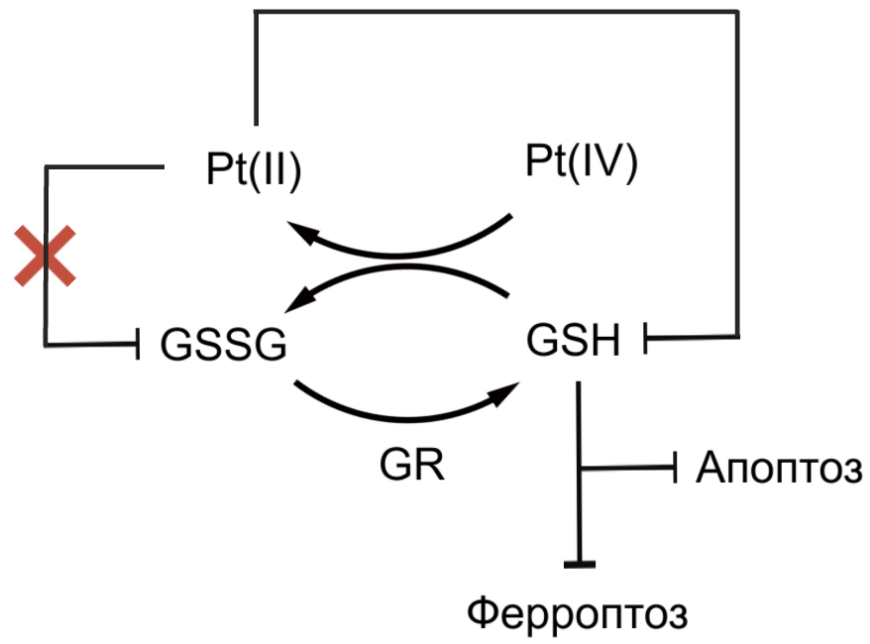


Рисунок 2.32 – Установленный противоопухолевый механизм разработанного комплекса платины(IV). GSH: восстановленный глутатион; GSSG: окисленный глутатион; GR: глутатионредуктаза

Глава 3. Экспериментальная часть

3.1. Культивирование клеток

Исследования проведены на культивируемых клетках глиобластомы человека (A172, ATCC CRL 1620), карциномы легкого человека (A549, ATCC CCL 185), карциномы печени человека (HepG2, ATCC HB 8065), почки эмбриона человека (HEK293, ATCC CRL 1573), полученных из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН (Россия, г. Санкт-Петербург). Клетки культивировали с использованием среды DMEM/F-12 фирмы «Биолот» с содержанием 10 % фетальной бычьей сыворотки фирмы «Биолот» при 37 °C, 5 % CO₂ и 98 % влажности в инкубаторе CB220 фирмы «Binder». Субкультивирование с применением раствора трипсина 0,25 % фирмы «Биолот» проводили при достижении культурой ≥ 90 % конфлюэнтности. Протокол субкультивирования:

1. Подготовка оператора. Перед началом лабораторной работы обрабатывали руки и надевали стерильные перчатки.
2. Подготовка ламинарного шкафа. Ультрафиолетовый свет (УФ) в ламинарном шкафу МБ-II-«Ламинар-С»-1,2, фирмы «Lamsystems» 15 минут. Обрабатывали антисептиком поверхности. Необходимые реагенты и расходные материалы обрабатывали антисептиком и помещали внутрь ламинарного бокса.
3. Начало работы в ламинарном шкафу. Меняли перчатки, садились в ламинарный шкаф. Обрабатывали антисептиком: руки, дозаторы, рабочую зону ламинарного шкафа. Внутри ламинарного шкафа повторно обрабатывали все необходимые реагенты и расходные материалы. После полного высыхания антисептика, начинали работу с клеточной культурой.
4. Оценка клеточной культуры. Макроскопически оценивали клеточную культуру: закисленность среды, признаки контаминации (замутнение, опалесценция и др.). С помощью микроскопа «XDS-3FL4» фирмы «Optika» микроскопически оценивали клеточную культуру: плотность клеточного роста культуры (конфлюэнтность), отсутствие контаминации, равномерность роста.
5. Промывка буфером. Из культурального флакона (КФ) сливали кондиционную среду и вносили PBS фирмы «Биолот» для отмывки клеток от остатков питательной среды, затем PBS также сливали.
6. Трипсинизация. Вносили в КФ 0,25 % раствор трипсина, выдерживали в течение 30 секунд. Инкубировали флакон с культурой при комнатной температуре до полного ошаривания и открепления клеток.

7. Нейтрализация. После открепления клеток от поверхности – вносили в КФ нейтрализующую смесь (смесь питательной среды и ФБС в соотношении 4:1), тщательно пипетировали клеточную суспензию.

8. Окончание работы. Удаляли избыток клеток и вносили свежую питательную среду и ФБС (соотношение 9:1). Повторно тщательно пипетировали и размещали в инкубаторе при условиях: 5 % CO₂, t = 37 °C, 95 % влажности.

3.2. Оценка растворимости соединений

Оценка растворимости веществ является обязательным этапом перед тестированием на клеточных культурах. Для химических соединений с известной молярной массой расчеты проводятся в молярных концентрациях (моль/л, М).

1. Исходные данные для расчета. Пример – цисплатин:
 - Молярная масса соединения: 300 г/моль.
 - Планируемый диапазон концентраций в лунке: от 8 до 1024 мкмоль/л.
 - Объем среды в лунке 96-луночного планшета (среда, ФБС, клетки): 200 мкл.
 - Схема внесения: с 4 ряда, последовательные объемы внесения – 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 мкл (6 повторов на каждую концентрацию).

- Кратность разбавления при внесении: $200/1 = 200$ раз.
2. Расчет навески для приготовления исходного раствора. Для приготовления 0,1 М раствора объемом 100 мкл:

$$m = M \times C \times V = 300 \text{ г/моль} \times 0,1 \text{ моль/л} \times (100 \times 10^{-6}) \text{ л} = 0,003 \text{ г} = 3 \text{ мг.}$$

3. Расчет концентрации вносимого раствора и разведения. Для получения в лунке концентрации 8 мкмоль/л при внесении 1 мкл:

$$C(\text{вносимого раствора}) = 8 \text{ мкмоль/л} \times 200 = 1600 \text{ мкмоль/л} = 0,0016 \text{ М.}$$

Кратность разведения исходного раствора (0,1 М) до вносимого (0,0016 М):

$$n = 0,1 \text{ М} / 0,0016 \text{ М} = 62,5 \text{ раза.}$$

4. Расчет объемов для приготовления рабочего раствора. Объем исходного 0,1 М раствора для приготовления 2500 мкл рабочего раствора:

$$V(\text{исх.}) = 2500 \text{ мкл} / 62,5 = 40 \text{ мкл.}$$

5. Контроль концентрации ДМСО. Концентрация ДМСО в культуральной среде не должна превышать 0,5 %, так как более высокие концентрации могут оказывать цитотоксический эффект и приводить к ложноположительным результатам.

6. Проверка растворимости методом последовательных разведений. Перед тестированием на клетках проводили проверку растворимости соединения в водном растворе (PBS).

- Раствор 1 (0,1 М): навеска 3 мг в 100 мкл ДМСО.
- Раствор 1.1: 40 мкл раствора 1 + 2460 мкл PBS (диапазон 8–1024 мкмоль/л).

При отсутствии осадка – растворимость подтверждается, использовали исходную схему.

При выпадении осадка проводили последовательное разведение исходного раствора ДМСО с уменьшением целевого диапазона концентраций в 2 раза на каждом этапе:

Таблица 3.1 – Схема последовательного разведения исходного раствора для проверки растворимости

Этап	Исходный раствор	Объем ДМСО	Концентрация исходного раствора	Диапазон концентраций в лунке
1	Раствор 1	100 мкл	0,1 М	8–1024 мкмоль/л
2	Раствор 2: 60 мкл раствора 1 доводится ДМСО до 120 мкл	120 мкл	0,05 М	4–512 мкмоль/л
3	Раствор 3: 80 мкл раствора 2 доводится ДМСО до 160 мкл	160 мкл	0,025 М	2–256 мкмоль/л
4	Раствор 4: 120 мкл раствора 3 доводится ДМСО до 240 мкл	240 мкл	0,0125 М	1–128 мкмоль/л

7. Пересчет при изменении исходной концентрации. Если соединение растворяется только при более низкой концентрации исходного раствора, тестирование проводили в соответствующем уменьшенном диапазоне концентраций. При необходимости разбег тестируемых концентраций может быть изменён в пределах допустимой растворимости вещества.

8. Фиксация результатов. По окончании проверки фиксировали концентрацию исходного раствора в ДМСО, при которой достигнута растворимость (0,1 М, 0,05 М, 0,025 М или 0,0125 М); итоговый диапазон концентраций для тестирования на клетках; объемы и расчеты для приготовления рабочего раствора.

3.3. Оценка цитотоксичности *in vitro*

Клетки высевали в 96-луночный планшет (4×10^3 клеток/лунку), через сутки добавляли исследуемые соединения в диапазоне концентраций на 72 часа. После инкубации с соединениями вносили МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия) (20 мкл, 5 мг/мл) фирмы «Диаэм», ещё через 2 часа заменяли среду на смесь ДМСО:ИПС (1:1) и измеряли оптическую плотность при 570 нм на планшетном спектрофотометре Victor Nivo фирмы «PerkinElmer». Исходные растворы (0,0125 моль/л) готовили в ДМСО, затем разбавляли средой DMEM/F-12 с

ФБС до рабочей концентрации, конечное содержание ДМСО не превышало 0,5 %. Протокол МТТ-теста включал в себя следующие этапы:

1. Внесение рабочей питательной среды в 96-луночный планшет. Подготавливали рабочее место согласно протоколу 3.1. Раскапывали 96-луночный планшет питательной средой и ФБС (10 %) – в крайние лунки по 200 мкл, внутрь – по 180–190 мкл.

2. Пассирование клеток. Проводили стандартную процедуру субкультивирования (см. протокол 3.1). На этапе нейтрализации – отбирали необходимое количество клеточной суспензии в стерильную пробирку, перед отбором тщательно пипетировали. Необходимое разбавление определяли на основании концентрации клеток, полученной на автоматическом счетчике «C100» фирмы «RWD». После завершения работы с культуральным флаконом в ламинарный бокс помещали предварительно подготовленный 96-луночный планшет с DMEM/F-12 и ФБС. Вносили клетки: пипетировали суспензию 25–40 раз перед внесением и 5–7 раз после каждого ряда; наконечник погружали перпендикулярно в толщу жидкости, не касаясь дна. Убирали планшет в инкубатор на сутки.

3. Внесение исследуемых веществ. Проводили микроскопию каждой лунки для оценки равномерности роста и конфлюэнтности. Подготавливали рабочее место согласно протоколу 3.1. Подготавливали раствор соединения в соответствии с проведёнными расчётами и вносили соединение в планшет. Культуры перемещали в инкубатор на 72 часа.

4. МТТ-тест. Подготавливали рабочее место согласно протоколу 3.1. Рабочая концентрация МТТ – 5 мг/мл (на один планшет требуется 7,5 мг МТТ на 1,5 мл питательной среды). Навеску отмеряли на весах ХРЕ204S фирмы «Mettler Toledo». Вносили раствор МТТ в 96-луночный планшет. Убирали планшет в инкубатор на 2 часа. Отбирали все содержимое лунок, помимо образовавшихся кристаллов формазана. Добавляли в лунки смесь ДМСО:ИПС (1:1). Помещали планшет на вибрационный шейкер на 20–30 минут для полной солюбилизации кристаллов формазана и равномерного перемешивания раствора. Измеряли оптическую плотность при 570 нм на планшетном спектрофотометре.

5. Расчёт средней ингибиторной концентрации (IC_{50}).

3.4. Детектирование раннего апоптоза

Для количественной оценки доли клеток на различных стадиях апоптоза, а также общей популяции нежизнеспособных клеток, использовали подход двойной флуоресцентной окраски с применением аннексина V-FITC и йодида пропидия (PI). За сутки до обработки, клетки высевали в чашки Петри фирмы «Jet Biofil» диаметром 35 мм. На следующий день исследуемые соединения вносили в предварительно определенных концентрациях IC_{50} . После 72-часовой инкубации каждый образец собирали и центрифугировали в центрифуге 2-16KL фирмы «Sigma» при 200 g и +4° C в течение 5 мин. Клеточный осадок аккуратно ресуспендировали в 25 мкл

связывающего буфера фирмы «Servisbio», после чего добавляли по 2,5 мкл раствора каждого флуорохрома. Смесь инкубировали в темноте в течение 10 мин. Затем 10 мкл окрашенной клеточной суспензии наносили на одноразовый счетный слайд и проводили флуоресцентный анализ с использованием автоматического счетчика клеток «C100» фирмы «RWD». Протокол включал в себя следующие этапы:

1. Подготовка чашек Петри. Проводили стандартную процедуру субкультивирования с требуемой культурой (см. протокол 3.1). В промаркированные чашки Петри диаметром 35 мм вносили питательную среду и ФБС (10%). На этапе нейтрализации производили отбор необходимого количества клеточной суспензии в стерильную пробирку, перед этим тщательно пипетировали клетки. На чашку рассаживали $4-8 \times 10^4$ клеток (в зависимости от культуры). После окончания работы с культуральным флаконом клетки в пробирке тщательно пипетировали и рассаживали в чашку Петри так, чтобы весь объем клеточной суспензии распределился равномерно на поверхность чашки. Убирали планшет в инкубатор на 24 ч.

2. Внесение исследуемых веществ. На следующий день в чашки Петри вносили исследуемые вещества в концентрации IC_{50} . В контрольной чашке (без вещества) производили замену среды на свежую в том же объеме, который отбирали для внесения соединений в другие чашки. При необходимости возможна полная замена среды как в контрольных пробах, так и в обработанных. Выдержка с веществами составляла 72 часа.

3. Снятие клеток с чашек Петри перед окрашиванием. Микроскопировали каждую чашку Петри (включая контрольную) для оценки конфлюэнтности, количества мёртвых клеток и признаков контаминации. Подготавливали центрифужные пробирки на 15 мл (по одной на чашку) с маркировкой. Помещали чашки Петри в ламинарный бокс. Переносили все содержимое чашек автоматической пипеткой в пробирки, вносили по 2 мл PBS по каплям или по стенке для отмывки клеток. Переносили PBS из чашек в соответствующие пробирки. Вносили по 0,75 мл 0,25 % раствора трипсина на 30 секунд, затем переносили в соответствующие пробирки. После открепления клеток – проводили нейтрализацию трипсина смесью питательной среды (0,8 мл) и ФБС (0,2 мл) и пипетировали. Содержимое чашек переносили в соответствующие пробирки. Центрифугировали 5 минут при 200 g и +4 °C. Удаляли супернатант. Осадок ресуспендировали в 25 мкл питательной среды и переносили в эппендорф для окрашивания.

4. Подсчет клеток на автоматическом счетчике (работа в темноте). Клетки в эппендорфе тщательно пипетировали, затем вносили 25 мкл $1 \times$ связывающего буфера, 2,5 мкл PI и 2,5 мкл Annexin V-FITC из набора реагентов. Пипетировали, после чего выдерживали пробу 10 минут в темноте. По истечении заданного времени проводили пипетирование, переносили 10 мкл в слайд для подсчета клеток, осуществляли подсчет в флуоресцентном режиме, результаты сохраняли на USB-диск.

5. Статистическую обработку и анализ изображений проводили в соответствии с пунктами 3.14 и 3.15.

3.5. Измерение активных форм кислорода

Изучение продукции активных форм кислорода в живых клетках проводили с использованием флуоресцентного красителя H_2DCFDA (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат) фирмы «Lumiprobe». Попадая внутрь клетки, он деацетируется клеточными эстеразами, из-за чего приобретает заряд и удерживается внутри клетки. Окисление активными формами кислорода приводит к образованию флуоресцирующего продукта – 2',7'-дихлорофлуоресцеина (максимум поглощения при 511 нм, максимум флуоресценции при 533 нм). Культуры клеток рассаживали в лунки 96-луночного планшета за день до внесения исследуемого вещества. Затем вносили растворы исследуемых соединений в концентрациях, равных значениям IC_{50} . Клетки инкубировали в течение 72 часов. Проводили окрашивание красителем H_2DCFDA (10 мкмоль/л) в течение 30 минут при 37 °C, 5 % CO_2 и 98 % влажности в темноте. Микроскопию проводили с помощью микроскопа «XDS-3FL4» фирмы «Optika». Протокол включал в себя следующие этапы:

1. Подготовка 96-луночного планшета. Проводили стандартную процедуру субкультивирования (см. протокол 3.1). На этапе нейтрализации осуществляли отбор необходимого количества клеточной суспензии в стерильную пробирку. Разбавление определяли на основании измеренной концентрации клеток на автоматическом счетчике клеток «C100» фирмы «RWD». После завершения работы с культуральным флаконом, клетки рассаживали в 96-луночный планшет в концентрации 4×10^3 клеток на лунку. Планшет убирали в инкубатор на сутки.

2. Внесение исследуемых соединений. На следующий день в лунки 96-луночного планшета вносили исследуемые вещества в концентрациях, равной IC_{50} . В контрольных лунках (без вещества) производили замену среды на свежую в том же объеме, который отбирается для внесения соединений в другие лунки. При необходимости возможна полная замена среды как в контрольных пробах, так и в обработанных. Выдержка с соединениями составляла 72 часа.

3. Приготовление раствора красителя. Приготовление 0,1-молярного раствора красителя H_2DCFDA в ДМСО выполняли в нестерильных условиях в темноте. Разводили краситель до рабочей концентрации (10 мкмоль/л) в питательной среде для культивирования клеток в стерильных условиях в ламинарном боксе. Приготовление красителя производили строго в питательной среде без добавления ФБС, так как сыворотка содержит ферменты, расщепляющие H_2DCFDA .

4. Окрашивание клеток. Перед окрашиванием лунки 96-луночного планшета промывали буфером PBS однократно. Вносили свежую питательную среду (без ФБС) и

краситель H_2DCFDA в конечной концентрации 10 мкмоль/л. Планшет помещали в CO_2 -инкубатор на 30 минут. После инкубации планшет промывали буфером PBS 2 раза на качающемся шейкере.

5. Анализ результатов. Анализ результатов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа. Наличие выраженной зеленой флуоресценции в синем свете свидетельствует о продукции активных форм кислорода (АФК) в клетках. Выполняли документирование результатов: фотографии делали в светлопольном режиме и в режиме флуоресценции с голубым светом, номера фотографий фиксировали в соответствии с пробой для последующего наложения слоев и анализа данных.

6. Анализ изображений проводили в соответствии с пунктом 3.15.

В эксперименте с антиоксидантом, в качестве которого использовали N-ацетил-L-цистеин (NAC) фирмы «Диаэм», протокол аналогичен, но добавляли пробы, в которые одновременно с веществами вносятся NAC в концентрации 3 ммоль/л.

3.6. Исследование перекисного окисления липидного слоя мембран митохондрий

Изучение перекисного окисления кардиолипина в митохондриях живых клеток проводили с использованием флуоресцентного красителя MitoCLox фирмы «Lumiprobe». MitoCLox состоит из флуорофора BDP 581/591, несущего диенсодержащий мотив (C11), связанного с остатком трифенилфосфония (TPP) через длинный гибкий линкер с двумя амидными связями. Гибкий линкер MitoCLox имитирует пептид SS-20 (Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂), что делает данный индикатор специфичным для кардиолипина. Окисление диена в MitoCLox приводит к значительному увеличению флуоресценции BDP 581/591 при 520 нм и снижению его исходной флуоресценции при 590 нм. Таким образом, окисление MitoCLox может быть измерено либо как снижение поглощения при 588 нм, либо как увеличение эмиссии флуоресценции в ратиометрическом режиме при 520/590 нм [120].

Культуры клеток рассаживали в лунки 96-луночного планшета за день до внесения исследуемого вещества. Затем вносили растворы исследуемых соединений в концентрациях, соответствующих IC_{50} . Клетки инкубировали в течение 72 часов. Окрашивание красителем MitoCLox (200 Нмоль/л) проводили в течение 60 минут при 37 °C, 5 % CO_2 и 98 % влажности в темноте. После чего отмывали клетки от остатков красителя раствором PBS 5 раз. Микроскопию проводили с помощью «XDS-3FL4» фирмы «Optika». Протокол включал в себя следующие этапы:

1. Подготовка 96-луночного планшета аналогично 3.5.
2. Внесение исследуемых веществ аналогично 3.5.

3. Приготовление раствора красителя. Навеску красителя растворяли в ДМСО в нестерильных условиях, после чего производили разведение красителя до рабочей концентрации (200 нмоль/л) в питательной среде для культивирования клеток в стерильных условиях в ламинарном боксе.

4. Окрашивание клеток. Перед окрашиванием лунки 96-луночного планшета промывали буфером PBS однократно. Вносили свежую питательную среду и краситель MitoCLox в конечной концентрации 200 нмоль/л. Планшет помещали в CO₂-инкубатор на 60 минут. После инкубации планшет промывали буфером PBS 5 раз на качающемся шейкере.

7. Анализ результатов. Анализ результатов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа. Выполняли документирование результатов: фотографии делали в режиме флуоресценции с голубым и зеленым светом, номера фотографий фиксировали в соответствии с пробой для последующего наложения слоев и анализа данных.

5. Статистическую обработку и анализ изображений проводили в соответствии с пунктами 3.14 и 3.15.

3.7. Детектирование изменений потенциала ВММ

Определение трансмембранного потенциала ($\Delta\psi_m$) митохондрий проводили с использованием красителя JC-1 фирмы «Servicebio» (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолил-карбоцианин йодид). Благодаря своим липофильным свойствам молекулы JC-1 проникают через мембрану в цитоплазму клеток, а катионные свойства способствуют накоплению в местах с повышенным содержанием протонов (прежде всего в митохондриях), формируя скопления J-агрегатов. Культуры клеток рассаживали в лунки 96-луночного планшета за день до внесения исследуемого вещества. Затем вносили растворы исследуемых соединений в концентрациях IC₅₀. Клетки инкубировали в течение 72 часов. Окрашивание красителем JC-1 проводили в течение 30 минут при 37 °C, 5 % CO₂ и 98 % влажности в темноте. В качестве положительного контроля использовали лунку, которую предварительно выдерживали 30 минут с реагентом СССР 100 мкмоль/л (карбонилцианид 3-хлорфенилгидразон) – переносчиком протонов (ионофором водорода) при 37 °C, 5 % CO₂ и 98 % влажности. СССР способствует изменениям проницаемости митохондрий для ионов водорода, что приводит к снижению мембранного потенциала. Микроскопию проводили с помощью «XDS-3FL4» фирмы «Optika» строго при одинаковой экспозиции для каждого из флуоресцентных сигналов. Протокол включал в себя следующие этапы:

1. Подготовка 96-луночного планшета аналогично 3.5.
2. Внесение исследуемых веществ аналогично 3.5.
3. Приготовление рабочего раствора красителя JC-1 (2×). Последовательно смешивали 0,2 мкл JC-1 500×, 90 мкл разбавителя JC-1 и 10 мкл буфера JC-1 10×. Для

приготовления красителя использовали пробирку из темного материала либо прозрачную пробирку, обернутую фольгой.

4. Приготовление буфера JC-1 (1×). Разводили буфер JC-1 10× в ddH₂O (40 мкл 10× буфера на 1 тест для двух промывок).

5. Приготовление рабочего раствора СССР для положительного контроля. Разводили СССР (100 Ммоль/л) в 1000 раз средой для культивирования клеток до конечной концентрации 100 мкмоль/л.

6. Подготовка планшета. Перед началом работы проводили подготовку рабочего места согласно протоколу 3.1. Для положительного контроля в соответствующую лунку 96-луночного планшета вносили 100 мкл рабочего раствора СССР 100 мкмоль/л, после чего клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 30 минут.

7. Внесение красителя. После инкубации промывали клетки буфером PBS (200 мкл на лунку). Вносили в лунки краситель JC-1 (2×) и среду для культивирования клеток в соотношении 1:1 (по 100 мкл каждого компонента на лунку). Инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 30 минут в темноте.

8. Отмывание от несвязанного красителя. Двукратно промывали клетки буфером JC-1 (1×): первая промывка – 200 мкл на лунку, вторая – 100 мкл на лунку. После промывок в каждую лунку добавляли 100 мкл буфера JC-1 (1×).

9. Микроскопический анализ. Анализ результатов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа. Нормальный митохондриальный мембранный потенциал характеризуется преобладанием красной флуоресценции (J-агрегаты), снижение потенциала сопровождается повышением зеленой флуоресценции (мономерная форма красителя).

10. Статистическую обработку и анализ изображений проводили в соответствии с пунктами 3.14 и 3.15.

В эксперименте с антиоксидантом, в качестве которого использовали N-ацетил-L-цистеин (NAC) фирмы «Диа-м», протокол аналогичен, но добавляли пробы, в которые одновременно с веществами вносили NAC в концентрации 3 ммоль/л.

3.8. Изучение морфологических изменений в клетках

Цитологический метод окрашивания по Романовскому – Гимзе использовали для изучения методом световой микроскопии морфологических изменений клеток при воздействии соединениями платины. Клетки рассаживали в чашки Петри диаметром 35 мм за день до внесения исследуемых веществ. Затем вносили растворы исследуемых соединений в тестируемой концентрации. Клетки инкубировали в течение 2 часов, после чего фиксировали с помощью 10 % раствора формальдегида. Далее производили окраску смесью Гимзы, клетки

отмывали от остатков красителя дистиллированной водой и проводили микроскопию в светлом поле. Протокол включал в себя следующие этапы:

1. Подготовка чашек Петри. Проводили стандартную процедуру субкультивирования с культурой (см. протокол 3.1). В чашки Петри, предварительно промаркированные, помещали покровное стекло, вносили питательную среду и ФБС (10 %). На этапе нейтрализации отбирали необходимое количество клеточной суспензии в стерильную пробирку. Необходимое разбавление клеток определяли на основании концентрации клеток, которую измеряли на автоматическом счетчике клеток. На чашку рассаживали 4×10^4 клеток. После завершения процедуры субкультивирования. Клеточную суспензию переносили в чашки Петри строго на покровное стекло. Чашки Петри убирали в инкубатор на сутки.

2. Внесение исследуемых агентов. На следующий день в чашки Петри вносили исследуемые вещества в концентрации IC_{50} . В контрольной чашке (без вещества) производили замену среды на свежую в том же объеме, который отбирали для внесения соединений в другие чашки. При необходимости возможна полная замена среды как в контрольных пробах, так и в обработанных. Выдержка с веществами 72 часа.

3. Приготовление красителя Романовского – Гимзы. Навешивали 75 мг красителя Романовского – Гимзы в пробирку объемом 15 мл. Добавляли 7,5 мл метанола и 2,56 мл глицерина, после чего убирали в термостат на 30 минут при 37 °C. По окончании краситель фильтровали через шприцевой фильтр в новую пробирку. Пробирку маркировали с указанием названия красителя и даты приготовления.

4. Фиксация клеток. Спустя 72 часа проводили микроскопирование чашек Петри для оценки равномерности роста и конфлюэнтности. Питательную среду удаляли, клетки отмывали от остатков питательной среды с помощью буфера PBS. При работе с несколькими чашками соблюдали последовательную обработку каждой чашки во избежание пересыхания клеточного монослоя. Для осуществления фиксации в чашку заливали 1 мл 10 % раствора формальдегида, выдерживали при температуре +4 °C в течение 30 минут. После фиксации формальдегид удаляли, в чашку заливали 2 мл буфера PBS для отмывки. Для более тщательной отмывки чашки помещали на качающийся шейкер на 2 минуты, после чего PBS удаляли.

5. Окрашивание. На покровное стекло вносили 300 мкл красителя Романовского – Гимзы. Выдерживали 2 минуты, после чего добавляется 1200 мкл PBS. Чашку помещали на качающийся шейкер на 2 минуты, затем краситель удаляли.

6. Отмывка и заключение препаратов. Проводили промывку покровного стекла под проточной водой. Для анализа результатов покровные стекла с помощью пинцета ненадолго помещали на марлевую салфетку клетками вверх для удаления излишней влаги. Обезжиривали предметные стекла этиловым спиртом. В центр предметных стекол наносили 4 капли смеси

канадского бальзама и ксилола. С помощью пинцета покровное стекло переносили на эту смесь клетками вниз и фиксировали. Предметное стекло маркировали и оставляли на ровной горизонтальной поверхности до полного высыхания канадского бальзама в смеси с ксилолом.

7. Микроскопический анализ. Проводили анализ результата с помощью микrofотосъемки на световом микроскопе: оценивали и описывали морфологическое строение клеток исследуемых культур.

8. Анализ изображений проводили в соответствии с пунктом 3.15.

3.9. Криоконсервация клеточных культур

Криоконсервация клеток необходима для хранения клеточных культур и создания резервного запаса клеточного материала. Оптимальная скорость охлаждения клеточного материала составляет 1 °C/мин, что достигается использованием емкостных штативов с изопропиловым спиртом либо специальных полимерных штативов, обеспечивающих требуемый режим охлаждения. Перед криоконсервацией проводили проверку культуры на соответствие критериям для замораживания: морфологические характеристики, стадия кривой роста (поздняя логарифмическая фаза перед выходом на плато), отсутствие признаков контаминации. Протокол:

1. Отмывка и трипсинизация. Подготавливали рабочее место согласно протоколу 3.1. Из КФ удаляли среду, вносили PBS для отмывки клеток от остатков питательной среды, после чего из флакона удаляли все содержимое. Для открепления клеток от поверхности вносили 0,25 % раствор трипсина, выдерживали 30 секунд, затем все содержимое удаляли. Флакон инкубировали при комнатной температуре до открепления клеток.

2. Нейтрализация и сбор клеток. После открепления клеток от поверхности вносили нейтрализующую смесь (20 % ФБС, 80 % среды DMEM/F-12). Тщательно пипетировали клеточную суспензию и переносили в центрифужную пробирку с конусным дном. Центрифугирование выполняли при 200 g и +4 °C в течение 5 минут.

3. Подготовка криопробирки. Выполняли маркировку криопробирки с указанием: культуры, объема КФ, криопротектора и даты заморозки.

4. Приготовление клеточной суспензии для замораживания. После центрифугирования аккуратно отбирали супернатант. Осадок ресуспендировали в 450 мкл среды и переносили в криопробирку, далее вносили равный объем ФБС и пипетировали. Затем капельно вносили криопротектор (ДМСО) до концентрации 10 % от итогового объема суспензии, плавно пипетировали.

5. Замораживание. Криопробирку устанавливали в криоштатив и убирали в морозильную камеру на –80 °C.

3.10. Размораживание клеточных культур

По мере необходимости, для обеспечения лабораторной деятельности проводили размораживание клеточных культур. Протокол размораживания:

1. Размораживание криопробирки. Подготавливали рабочее место согласно протоколу 3.1. Криопробирку доставали из морозильной камеры и размораживали при 37 °С. После оттаивания культуры содержимое криопробирки переносили в стерильную пробирку объемом 15 мл.

2. Отмывка от ДМСО. Медленно по каплям вносили питательную среду, плавно пипетировали и центрифугировали суспензию при 200 g и +4 °С 5 мин, удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в нужном количестве свежей питательной среды.

3. Культуральный флакон. Разведенную клеточную суспензию переносили в КФ, добавляли 10 % ФБС, пипетировали. Маркировали КФ с указанием: порядкового номера, названия клеточной линии, даты. КФ переносили в инкубатор строго горизонтально (параллельно полу), без наклонов, для сохранения равномерности клеточной суспензии.

3.11. Вестерн-блоттинг

Вестерн-блоттинг проводили в несколько последовательных этапов. Сначала лизировали клеточные пробы и разделяли белки методом вертикального электрофореза в течение 2,5 часов при 80 В и 4 °С, используя 4 % или 3 % концентрирующий гель фирмы «Bio-Rad» и 12 % или 8 % разделяющий гель фирмы «Bio-Rad». После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану фирмы «Bio-Rad» методом электроблоттинга при 350 мА в течение 1,5 часов при 4 °С. Затем мембраны блокировали в течение 30 минут с использованием блокирующего буфера «EveryBlot» фирмы «Bio-Rad». После этого мембраны инкубировали в течение ночи (16 часов) при 4 °С с кроличьими первичными антителами (табл. 3.2).

Таблица 3.2 – Характеристика первичных антител

№	Антитело	Масса, кДа	Артикул	Производитель (фирма)	Разведение
1	NRF2	97–110	A0674	ABclonal	1:500
2	GPX4	20	A25009	ABclonal	1:4000
3	HIF1A	120	PAA798Hu02	Cloud-Clone	1:750
4	PARP1	113 и 89	E-AB-12834	Elabscience	1:500
5	ACSL4	79	E-AB-14661	Elabscience	1:1000
5	β-tubulin	55	E-AB-20070	Elabscience	1:6000

После трех промывок PBS-Twin20 по 5 минут для удаления не связавшихся первичных антител мембраны инкубировали со вторичными антителами (анти-кролик) фирмы «Bio-Rad» в течение 1,5 часов. Наконец, мембраны трижды промывали PBS-Twin20 (по 5 минут) для удаления не связавшихся вторичных антител перед детекцией сигнала. Протокол включал в себя следующие этапы:

1. Подготовка к лизису. Клетки рассаживали во флаконы площадью 182 см² фирмы «Jet Biofil». Инкубацию проводили при 37 °C, 98% влажности и 5% CO₂ в течение 24 часов. Затем вносили исследуемый агент в требуемой концентрации, инкубировали в течении 2-х часов или 24-х часов. Микроскопировали для оценки влияния веществ на клеточную культуру.

2. Лизис клеток. Кондиционную среду сливали в центрифужные пробирки и центрифугировали при 200 g в течение 5 минут при +4 °C для концентрирования открепленных клеток. Клеточный монослой отмывали холодным PBS два раза; при отмывке использованный раствор буфера сливали в стакан или удаляли аспирацией. Приготовление лизисного буфера (ЛБ): смешивали RIPA-буфер 1× фирмы «Millipore», PMSF (100 Ммоль/л) фирмы «TransGen» и коктейль ингибиторов протеаз (100×). Лизисный буфер вносили на клеточный монослой по каплям до покрытия всей поверхности флакона. Флакон помещали на лед на 5 минут. Монослой снимали с помощью скребка, все содержимое переносили в эппендорф объемом 1,5 мл. Образец помещали на лед при +4 °C на 20 минут. По истечении времени эппендорфы центрифугировали при 13000 g в течение 30 минут при +2 °C для осаждения клеточного дебриса и получения раствора белков. После центрифугирования выполняли нормализацию по общему белку с помощью набора «BCA Protein Assay Kit» фирмы «Millipore».

3. Нормализация по общему белку (BCA-метод). Метод основан на биуретовой реакции: в щелочной среде ионы меди Cu²⁺ взаимодействуют с пептидными связями белка, восстанавливаясь до Cu⁺. Бицинониновая кислота (BCA) образует с ионами Cu⁺ прочный комплекс, имеющий интенсивную фиолетовую окраску. Приготовление калибровочной кривой (стандарт BSA (бычий сывороточный альбумин) 2 мг/мл) представлено в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Разведения для калибровочной кривой

Раствор	Компоненты
Раствор 1	50 мкл BSA (2 мг/мл) + 50 мкл PBS
Раствор 2	50 мкл раствора 1 + 50 мкл PBS
Раствор 3	60 мкл раствора 2 + 50 мкл PBS
Раствор 4	20 мкл раствора 3 + 50 мкл PBS
Раствор 5	80 мкл PBS

Растворы для калибровочной кривой вносили в 96-луночный планшет. Добавляли белковые лизаты (при необходимости разбавленные PBS или RIPA-буфером), ВСА и медь. Инкубацию проводили при 37 °С в течение 15 минут. Измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре при 570 нм, выполняли расчеты концентрации белка в образцах.

4. Подготовка проб для электрофореза. В вытяжке смешивали 4× буфер Лэммли с 2-меркаптоэтанолом. Пробы разбавляли RIPA-буфером, добавляли смесь 4× буфера Лэммли с 2-меркаптоэтанолом согласно проведенным расчетам. Затем пробы помещали в твердотельный термостат на 5 минут при 95 °С и центрифугировали при 16000 g в течение 1 минуты при +2 °С.

5. Приготовление геля. Гель готовили из смеси компонентов:

- Акриламид и N,N'-метиленабисакриламид (бис-акриламид): акриламид формирует полимерную сеть, бис-акриламид выступает в роли сшивающего агента. Соотношение акриламида и бис-акриламида определяет размер пор.

- Буфер (Tris-HCl): задает pH среды.
- SDS (лаурилсульфат натрия): обеспечивает одинаковый отрицательный заряд и денатурацию белков.

- Инициаторы полимеризации: APS (персульфат аммония) запускает реакцию, TEMED (N,N,N',N'-Тетраметилэтилендиамин) ускоряет полимеризацию.

- Вода: растворитель.

Концентрирующий гель (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8): предназначен для фокусировки белковых молекул в узкую стартовую линию перед входом в разделяющий гель.

Разделяющий гель (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8): предназначен для разделения белков по молекулярной массе.

Выбор концентрации геля зависит от молекулярной массы целевых белков:

- 4% концентрирующий / 12% разделяющий – для низкомолекулярных белков (до 40 кДа).

- 3% концентрирующий / 8% разделяющий – для высокомолекулярных белков (от 40 кДа).

APS и TEMED вносили непосредственно перед заливкой геля. Собирали кассету. Заливали разделяющий гель, на поверхность добавляли 70 % этиловый спирт, оставляли на 30 минут. Спирт удаляли с помощью фильтровальной бумаги, заливали концентрирующий гель, устанавливали гребенку, оставляли на 15 минут. При необходимости гель оставляли на хранение в холодильнике при +4 °С в дистиллированной воде.

6. Электрофорез. Собирали установку для электрофореза, проверяли герметичность. Раннинг-буфер фирмы «Bio-Rad» заливали между стеклами, затем в камеру до отметки на

установке. Гребенку удаляли, лунки промывали буфером с помощью автоматического дозатора. Вносили маркер молекулярной массы (линейка) и образцы. Установку подключали к источнику питания (80–100 В) и помещали при +4 °С на 3 часа.

7. Трансфер на мембрану. После завершения электрофореза извлекали гель из кассеты. Собирали «сэндвич»: в лоток наливали трансфер-буфер, помещали кассету с губками и фильтровальной бумагой. На гладкую сторону фильтровальной бумаги укладывали гель, сверху накрывали нитроцеллюлозной мембраной, прокатывали валиком для удаления пузырей. Поверх мембраны укладывали фильтровальную бумагу гладкой стороной к мембране, повторно прокатывали валиком, накрывали губкой. Кассету закрывали в лотке и помещали в установку для трансфера, заливали трансфер-буфер фирмы «Bio-Rad». Установку убирали в холодильник при +4 °С, подключали к источнику питания (350 мА) на 1,5 часа.

8. Блокирование мембраны. После трансфера на мембране находятся целевые белки и свободные участки, обладающие высокой неспецифической связывающей способностью. Блокирование проводили для предотвращения неспецифического связывания антител с мембраной. Отсутствие блокирования приводит к высокому равномерному фону, нечетким полосам и ложноположительным сигналам. Мембрану помещали на 30 минут в блокирующий буфер «EveryBlot» фирмы «Bio-Rad» на качающийся шейкер.

9. Инкубация с первичными антителами. Первичные антитела готовили в блокирующем растворе в соответствии с инструкцией производителя. Проводили инкубацию мембраны с раствором первичных антител в течение 16 часов.

10. Отмывка от первичных антител. Отмывку выполняли с использованием PBS-T (PBS с Tween 20): на 500 мл PBS добавляли 500 мкл Tween 20. Tween 20 – неионный детергент, гидрофобные хвосты которого встраиваются в гидрофобные участки, а гидрофильные головки остаются в воде, формируя мицеллы. Tween 20 эффективно разрушает слабые неспецифические связи, но не нарушает прочные специфические комплексы антитело-антиген.

11. Инкубация со вторичными антителами. Вторичные антитела подбирали против вида животного, в котором были выработаны первичные антитела. Вторичные антитела конъюгированы с ферментом (пероксидазой хрена, HRP), что обеспечивает последующую детекцию.

12. Отмывка от вторичных антител. Отмывку проводили PBS-T (PBS с Tween 20) три раза по 5 минут на качающемся шейкере фирмы «Biosan».

13. Детекция хемилюминесценции. Детекция основана на хемилюминесцентной реакции, катализируемой пероксидазой хрена (HRP), конъюгированной со вторичными антителами. Люминол (субстрат) в присутствии перекиси водорода (H_2O_2 , окислитель) под действием HRP окисляется, образуя дианион 3-аминофталата в возбужденном состоянии.

11. Статистическую обработку и анализ изображений проводили в соответствии с пунктами 3.14 и 3.15.

3.12. ПЦР

Для выделения суммарной РНК и проведения обратной транскрипции клетки линии A172 высевали в культуральные флаконы 25 см². Далее через 24 часа вносили исследуемые соединения в концентрациях, соответствующих IC₅₀. Затем через 24 часа экстрагировали суммарную РНК с использованием реагента ExtractRNA фирмы «Евроген», в соответствии с протоколом производителя. Сухой осадок растворяли в 30 мкл воды без нуклеаз обработанной диэтилпирокарбонатом (DEPC) фирмы «Евроген». Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов «Реверта – L» фирмы «АмплиСенс». РНК подвергали обратной транскрипции путем инкубации смеси в термоциклере фирмы «DLAB» при 37 °C 30 минут.

Для оценки уровня экспрессии маркеров ферроптоза в клетках амплификацию проводили в режиме реального времени на приборе «Accurate 96» фирмы «DLAB». Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 6 мкл кДНК, 0,8 пмоль каждого праймера, 12,5 мкл приготовленной смеси 2X HS-qPCR SYBR Blue фирмы «Biolabmix». Температурный режим амплификации: 95 °C – 5 минут, затем 40 циклов (95 °C – 10 секунд, 62 °C – 20 секунд, 72 °C – 20 секунд). В качестве внутреннего контроля использовали уровень экспрессии гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH).

3.13. Синтез

Исходные реагенты коммерчески доступны и использовались без дополнительной очистки (Sigma Aldrich, Merck, TCI).

ИК спектры веществ записаны с помощью ИК спектрометра Bruker Alpha в KBr, а также с использованием приставки НПВО (кристалл ZnSe). Температура плавления определялась в открытых капиллярах, на приборе Stuart SMP30. Контроль за ходом реакций осуществлялся с помощью ТСХ на пластинах Sorbfil UV-254 с проявлением ультрафиолетом. Элементный анализ производился на анализаторе a Perkin-Elmer 2400 Series II CHNS / O. Спектры ЯМР ¹H, ¹³C и ¹⁹⁵Pt записаны в растворах ДМСО-d₆ и CDCl₃ на спектрометре Bruker AVANCE NEO (600 МГц для ¹H, 151 МГц для ¹³C и 129 МГц для ¹⁹⁵Pt). Химические сдвиги в спектрах ЯМР ¹H приведены относительно остаточного сигнала CHCl₃ (δ_H 7.26 м.д.) для растворов в CDCl₃, остаточного сигнала (CHD₂)CD₃SO (δ_H 2.50 м.д.) для растворов в ДМСО-d₆. Химические сдвиги в спектрах ЯМР ¹³C приведены относительно центрального сигнала растворителя (δ_C 77.16 м.д. для растворов в CDCl₃ и δ_C 39.52 м.д. для растворов в ДМСО-d₆). Масс-спектры электронной

ионизации были записаны на хромато-масс спектрофотометре «GCMS-QP2010 Ultra» фирмы «Shimadzu».

Соединения **2.2e-h** были описаны ранее [91]. Методики их синтеза использовались с несущественными модификациями.

Хлорплатинат(II) 6-(4-гидроксифенил)-2,2'-бипиридина (**2.2a**), хлорплатинат(II) 6-(4-метоксифенил)-2,2'-бипиридина (**2.2b**), хлорплатинат(II) 6-(4-этоксифенил)-2,2'-бипиридина (**2.2c**), хлорплатинат(II) 6-(4-(изопентоксифенил)-2,2'-бипиридина (**2.2d**), хлорплатинат(II) 6-(4-(2-этилгексил)оксифенил)-2,2'-бипиридина (**2.2e**), хлорплатинат(II) 6-(4-гидроксифенил)-4-фенил-2,2'-бипиридина (**2.2f**), хлорплатинат(II) 6-(4-метоксифенил)-4-фенил-2,2'-бипиридина (**2.2g**), хлорплатинат(II) 6-(4-(2-этилгексил)оксифенил)-4-фенил-2,2'-бипиридина (**2.2h**).

K₂PtCl₄ (0,5 ммоль) и соответствующий лиганд (0,5 ммоль) растворяли в AcOH (25 мл). Реакционную массу кипятили в атмосфере аргона в течении 14 часов. По окончании охлаждали до комнатной температуры, осадок отфильтровывали и промывали водой (15 мл), метанолом (15 мл). Продукт перекристаллизовывали из смеси ДМСО-вода.

Трихлорплатинат(IV) 6-(4-метоксифенил)-2,2'-бипиридина (**2.3a**), трихлорплатинат(IV) 6-(4-(2-этилгексил)оксифенил)-2,2'-бипиридина (**2.3b**).

Платиновый комплекс (0,15 ммоль) растворяли в ДМСО (3 мл) при комнатной температуре после чего медленно добавляли HCl до образования осадка. Реакционную массу выдерживали при нагревании (60 °C) и перемешивании в течении 3 ч, после чего добавляли воду (20 мл), образовавшийся желтый осадок отфильтровывали и промывали метанолом (5 мл).

Таблица 3.4 – Качественные и количественные характеристики полученных соединений

№	Брутто формула	Внешний вид	Элем. Анализ (расчётный, фактический)			Температура плавления, °C	Выход продукта, %	Пик молекулярного иона [M] ⁺ (I _{отн} %)
			C	N	H			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
2.1a	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O	Желто-коричневый порошок	77.40 <u>77.25</u>	11.28 <u>11.41</u>	4.87 <u>5.01</u>	207	35	248 (100)

№	Брутто формула	Внешний вид	Элем. Анализ (расчётный, фактический)			Темп ерату ра плавл ения, С°	Выход продук та, %	Пик молекуляр ного иона [M] ⁺ (I _{отн} (%))
			С <u>С</u>	Н <u>Н</u>	Н <u>Н</u>			
2.1b	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O	Светло- коричневый порошок	77.84 <u>77.96</u>	10.68 <u>10.83</u>	5.38 <u>5.11</u>	104	25	262 (100)
2.1c	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O	Коричневый порошок	78.24 <u>78.46</u>	10.14 <u>10.33</u>	5.84 <u>5.65</u>	96	27	276 (100)
2.1d	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O	Коричневые кристаллы	79.21 <u>79.45</u>	8.80 <u>9.01</u>	6.96 <u>6.80</u>	48	97	318 (50)
2.1e	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O	Коричневые кристаллы	79.96 <u>79.66</u>	7.77 <u>7.54</u>	7.83 <u>7.69</u>	41	95	360 (25)
2.1f	C ₂₂ H ₁₆ N ₂ O	Светло- серый порошок	81.46 <u>81.68</u>	8.64 <u>8.38</u>	4.97 <u>5.20</u>	>250	58	324 (100)
2.1g	C ₂₃ H ₁₈ N ₂ O	Серый порошок	81.63 <u>81.46</u>	8.28 <u>8.50</u>	5.36 <u>5.59</u>	104	36	338 (100)
2.1h	C ₃₀ H ₃₂ N ₂ O	Коричневое масло	82.53 <u>82.28</u>	6.42 <u>6.10</u>	7.39 <u>7.71</u>	-	94	436 (32)
2.2a	C ₁₆ H ₁₁ ClN ₂ OPt	Бледно- оранжевый порошок	40.22 <u>40.50</u>	5.86 <u>5.61</u>	2.3b 2 <u>2.11</u>	>250	84	
2.2b	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₂ OPt	Оранжевый порошок	41.52 <u>41.76</u>	5.70 <u>5.59</u>	2.66 <u>2.40</u>	>250	94	-
2.2c	C ₁₈ H ₁₅ ClN ₂ OPt	Оранжевый порошок	42.74 <u>42.55</u>	5.54 <u>5.20</u>	2.99 <u>3.21</u>	>250	82	-
2.2d	C ₂₁ H ₂₁ ClN ₂ OPt	Оранжевый порошок	46.03 <u>46.29</u>	5.11 <u>9.94</u>	3.86 <u>3.59</u>	>250	90	-
2.2e	C ₂₄ H ₂₇ ClN ₂ OPt	Оранжевый порошок	48.86 <u>48.61</u>	4.75 <u>4.51</u>	4.61 <u>4.25</u>	>250	89	-

№	Брутто формула	Внешний вид	Элем. Анализ (расчётный, фактический)			Темп ерату ра плавл ения, С°	Выход продук та, %	Пик молекуляр ного иона [M] ⁺ (I _{отн} (%))
			С <u>С</u>	N <u>N</u>	H <u>H</u>			
2.2f	C ₂₂ H ₁₅ ClN ₂ OPt	Бледно- оранжевый порошок	47.70 <u>47.91</u>	5.06 <u>5.24</u>	2.73 <u>2.59</u>	>250	90	-
2.2g	C ₂₃ H ₁₇ ClN ₂ OPt	Красный порошок	48.64 <u>48.85</u>	4.93 <u>5.13</u>	3.02 <u>2.91</u>	>250	97	-
2.2h	C ₃₀ H ₃₁ ClN ₂ OPt	Оранжевый порошок	54.09 <u>53.89</u>	4.21 <u>4.01</u>	4.69 <u>4.80</u>	>250	90	-
2.3a	C ₁₇ H ₁₃ Cl ₃ N ₂ OPt	Желтый порошок	36.28 <u>36.14</u>	4.98 <u>5.06</u>	2.33 <u>2.40</u>	>250	90	-
2.3b	C ₂₄ H ₂₇ Cl ₃ N ₂ OPt	Желтый порошок	43.62 <u>43.51</u>	4.24 <u>4.28</u>	4.12 <u>4.29</u>	>250	91	-

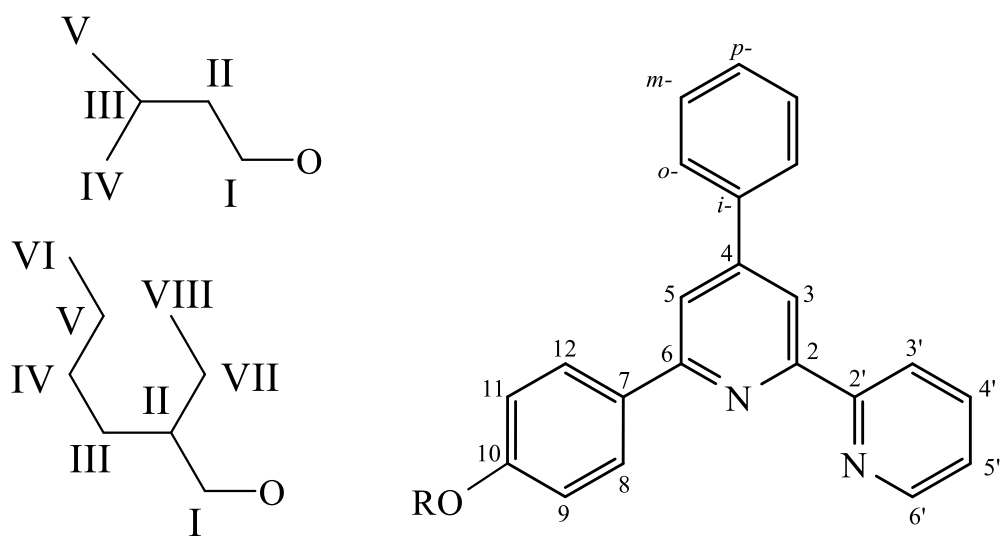
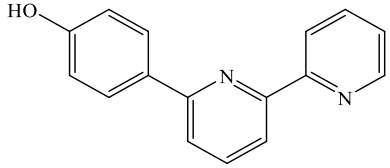
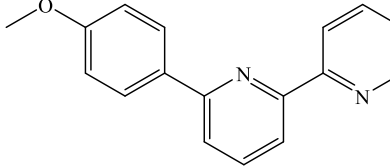
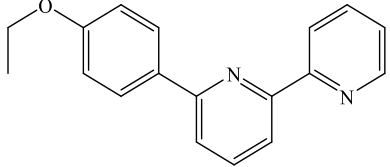
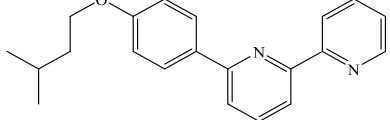
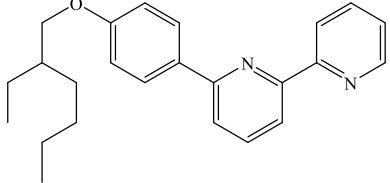
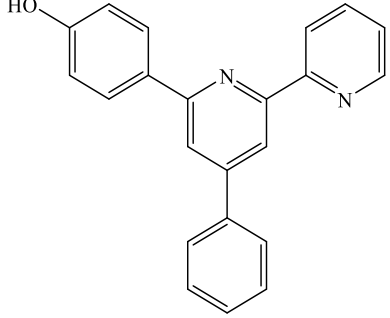
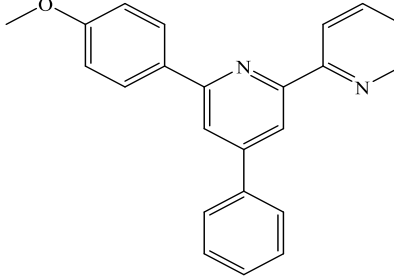
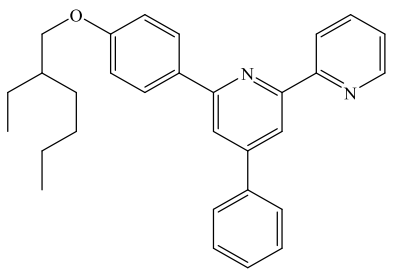


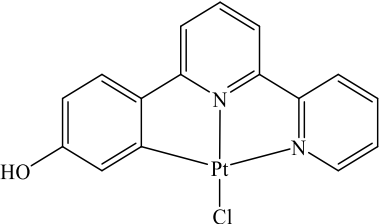
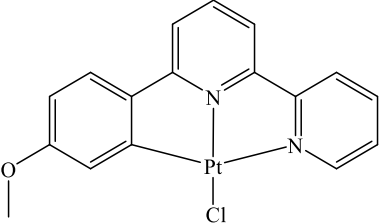
Рисунок 3.1 – Общая схема нумерации атомов арилбипиридинов

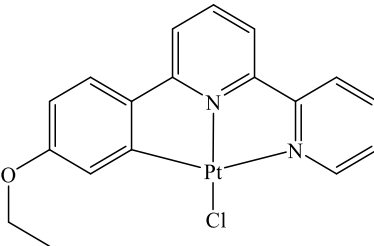
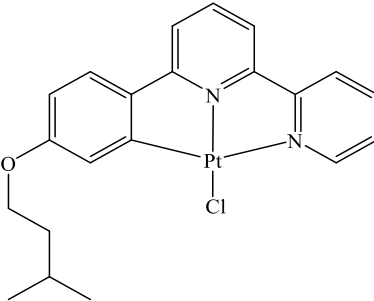
Таблица 3.5 – Спектральные характеристики

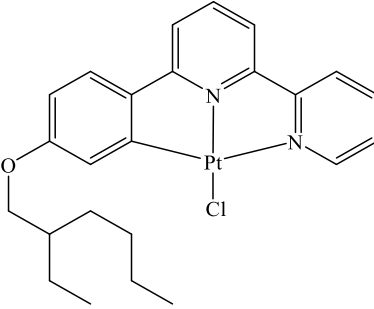
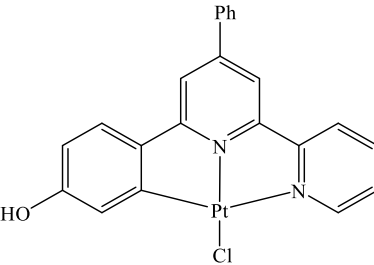
№	Структурная формула	Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д., КССВ (J), Гц Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.	ИК-спектр, ν , см $^{-1}$
1	2	3	4
2.1a		^1H ЯМР (600 МГц, ДМСО- d_6) δ 9.79 (s, 1H), 8.70 (d, $J = 4.7$ Гц, 1H), 8.57 (d, $J = 7.9$ Гц, 1H), 8.25 (d, $J = 7.6$ Гц, 1H), 8.10 (d, $J = 8.2$ Гц, 2H), 8.00 – 7.91 (m, 2H), 7.89 (d, $J = 7.8$ Гц, 1H), 7.48 – 7.43 (m, 1H), 6.93 (d, $J = 8.2$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 158.75, 155.60, 155.51, 154.70, 149.23, 138.13, 137.29, 129.39, 128.08, 124.16, 120.59, 119.27, 117.94, 115.59.	3066(C-H _{Ar}), 1606(C-C _{Ar}), 1582(C-C _{Ar}), 1178(C-O)
2.1b		^1H ЯМР (600 МГц, Chloroform- d) δ 8.69 (d, $J = 3.9$ Гц, 1H), 8.63 (d, $J = 7.9$ Гц, 1H), 8.32 (d, $J = 7.7$ Гц, 1H), 8.12 (d, $J = 8.8$ Гц, 2H), 7.88 – 7.82 (m, 2H), 7.71 (d, $J = 7.8$ Гц, 1H), 7.34 – 7.29 (m, 1H), 7.03 (d, $J = 8.8$ Гц, 2H), 3.89 (s, 3H). ^{13}C ЯМР (151 МГц, CDCl ₃) δ 160.66, 156.62, 156.25, 155.70, 149.18, 137.76, 136.97, 132.17, 128.35, 123.81, 121.41, 119.69, 118.74, 114.23, 55.53.	3061(C-H _{Ar}), 2957(C-H), 1607(C-C _{Ar}), 1582(C-C _{Ar}), 1248(C-O-C _{ассим}), 1022(C-O-C _{сим})
2.1c		^1H ЯМР (600 МГц, ДМСО- d_6) δ 8.70 (d, $J = 4.7$ Гц, 1H), 8.57 (d, $J = 7.9$ Гц, 1H), 8.28 (d, $J = 7.2$ Гц, 1H), 8.18 (d, $J = 8.7$ Гц, 2H), 8.01 – 7.93 (m, 3H), 7.47 (dd, $J = 7.3, 4.8$ Гц, 1H), 7.06 (d, $J = 8.7$ Гц, 2H), 4.10 (q, $J = 6.9$ Гц, 2H), 1.36 (t, $J = 7.0$ Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 159.60, 155.42, 155.25, 154.78, 149.25, 138.24, 137.32, 130.76, 128.00, 124.20, 120.59, 119.56, 118.24, 114.59, 63.17, 14.63.	3044(C-H _{Ar}), 2978(C-H), 1607(C-C _{Ar}), 1578(C-C _{Ar}), 1253(C-O-C _{ассим}), 1035(C-O-C _{сим})
2.1d		^1H ЯМР (600 МГц, Chloroform- d) δ 8.69 (d, $J = 4.6$ Гц, 1H), 8.64 (d, $J = 7.9$ Гц, 1H), 8.32 (d, $J = 7.7$ Гц, 1H), 8.10 (d, $J = 8.0$ Гц, 2H), 7.84 (t, $J = 7.7$ Гц, 2H), 7.70 (d, $J = 7.8$ Гц, 1H), 7.33 – 7.29 (m, 1H), 7.02 (d, $J = 8.2$ Гц, 2H), 4.07 (t, $J = 6.6$ Гц,	3047(C-H _{Ar}), 2960(C-H), 1606(C-C _{Ar}), 1582(C-C _{Ar}),

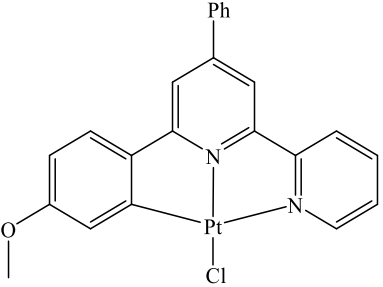
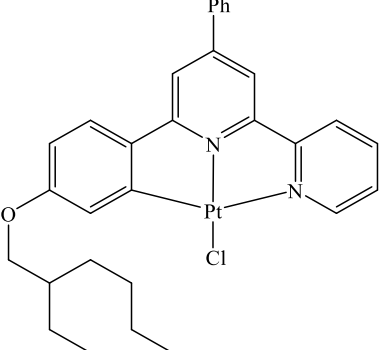
№	Структурная формула	Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д., КССВ (J), Гц Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.	ИК-спектр, ν , см^{-1}
		2H), 1.94 – 1.82 (m, 1H), 1.72 (q, $J = 6.6$ Гц, 2H), 0.99 (d, $J = 6.5$ Гц, 6H). ^{13}C ЯМР (151 МГц, CDCl_3) δ 160.22, 156.61, 156.27, 155.65, 149.14, 137.69, 136.91, 131.88, 128.27, 123.75, 121.37, 119.61, 118.64, 114.76, 66.58, 38.09, 25.18, 22.74.	1258(C-O-C _{ассим}), 1017(C-O-C _{сим})
2.1e		^1H ЯМР (600 МГц, Chloroform- d) δ 8.70 – 8.67 (m, 1H), 8.63 (d, $J = 7.9$ Гц, 1H), 8.30 (d, $J = 7.8$ Гц, 1H), 8.12 – 8.06 (m, 2H), 7.85 (t, $J = 7.8$ Гц, 2H), 7.71 (d, $J = 7.9$ Гц, 1H), 7.32 (ddd, $J = 7.5, 4.7, 1.2$ Гц, 1H), 7.06 – 6.98 (m, 2H), 3.96 – 3.88 (m, 2H), 1.77 (p, $J = 6.1$ Гц, 1H), 1.54 – 1.38 (m, 4H), 1.34 (td, $J = 6.1, 3.2$ Гц, 4H), 0.98 – 0.87 (m, 6H). ^{13}C ЯМР (151 МГц, CDCl_3) δ 160.54, 156.68, 156.38, 155.69, 149.18, 137.74, 136.98, 131.86, 128.29, 123.80, 121.44, 119.67, 118.66, 114.84, 70.78, 39.52, 30.68, 29.24, 24.01, 23.21, 14.25, 11.27.	3059(C-H _{Ar}), 2959(C-H), 2925(C-H), 1606(C-C _{Ar}), 1582(C-C _{Ar}), 1248(C-O-C _{ассим}), 1037(C-O-C _{сим})
2.1f		^1H ЯМР (600 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.80 (s, 1H), 8.76 – 8.72 (m, 1H), 8.61 (d, $J = 7.9$ Гц, 1H), 8.53 (d, $J = 1.5$ Гц, 1H), 8.22 (dt, 2H), 8.17 (d, $J = 1.6$ Гц, 1H), 8.01 (td, $J = 7.7, 1.8$ Гц, 1H), 7.96 (d, $J = 7.1$ Гц, 1H), 7.58 (t, $J = 7.6$ Гц, 2H), 7.54 – 7.51 (m, 1H), 7.51 – 7.48 (m, 1H), 6.93 (dt, 2H). ^{13}C ЯМР (151 МГц, DMSO) δ 158.83, 156.59, 155.42, 155.40, 149.32, 149.27, 137.86, 137.39, 129.43, 129.29, 129.22, 128.44, 127.08, 124.33, 120.82, 116.90, 115.52, 115.42.	3066(C-H _{Ar}), 1607(C-C _{Ar}), 1589(C-C _{Ar})

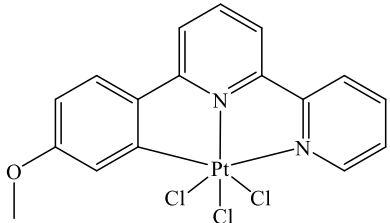
№	Структурная формула	Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д., КССВ (J), Гц Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.	ИК-спектр, ν , см $^{-1}$
2.1g		^1H ЯМР (600 МГц, ДМСО- d_6) δ 8.76 (ddd, $J = 4.8, 1.8, 0.9$ Гц, 1H), 8.65 (dt, $J = 7.9, 1.1$ Гц, 1H), 8.57 (d, $J = 1.5$ Гц, 1H), 8.35 – 8.32 (m, 2H), 8.24 (d, $J = 1.6$ Гц, 1H), 8.09 – 8.03 (m, 1H), 8.00 – 7.96 (m, 2H), 7.61 – 7.57 (m, 2H), 7.56 – 7.51 (m, 2H), 7.13 – 7.09 (m, 2H), 3.86 (s, 3H). ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 172.51, 161.21, 157.29, 150.52, 148.20, 137.58, 131.43, 130.78, 130.19, 129.71, 129.30, 128.80, 127.82, 126.34, 119.06, 117.68, 114.61, 79.66, 55.84, 21.55, 6.38.	3053(C-H _{Ar}), 2959(C-H), 1604(C-C _{Ar}), 1582(C-C _{Ar}), 1243(C-O-C _{ассим}), 1028(C-O-C _{сим})
2.1h		^1H ЯМР (600 МГц, Chloroform- d) δ 8.71 (ddd, $J = 4.6, 1.8, 0.9$ Гц, 1H), 8.68 (dt, $J = 8.0, 1.1$ Гц, 1H), 8.58 (d, $J = 1.5$ Гц, 1H), 8.17 – 8.14 (m, 2H), 7.92 (d, $J = 1.5$ Гц, 1H), 7.87 (td, $J = 7.8, 1.8$ Гц, 1H), 7.82 (d, $J = 7.1$ Гц, 2H), 7.52 (t, $J = 7.5$ Гц, 2H), 7.48 – 7.43 (m, 1H), 7.34 (ddd, $J = 7.4, 4.8, 1.1$ Гц, 1H), 7.07 – 7.02 (m, 2H), 3.97 – 3.90 (m, 2H), 1.78 (hept, $J = 6.3$ Гц, 1H), 1.57 – 1.38 (m, 4H), 1.39 – 1.29 (m, 4H), 0.99 – 0.87 (m, 6H). ^{13}C ЯМР (151 МГц, CDCl ₃) δ 160.59, 157.05, 156.66, 156.23, 150.31, 149.19, 139.12, 136.99, 131.96, 129.12, 129.04, 128.42, 127.41, 123.87, 121.65, 117.87, 116.96, 114.86, 70.79, 39.53, 30.69, 29.26, 24.02, 23.22, 14.26, 11.29.	3059(C-H _{Ar}), 2957(C-H), 1598(C-C _{Ar}), 1584(C-C _{Ar}), 1237(C-O-C _{ассим}), 1029(C-O-C _{сим})

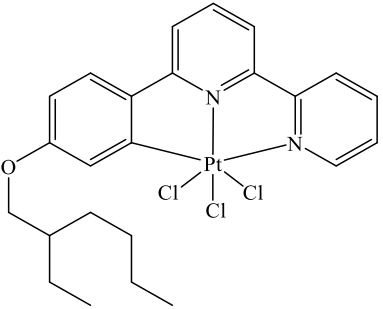
№	Структурная формула	Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д., КССВ (J), Гц Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.	ИК-спектр, ν , см^{-1}
2.2a		^1H ЯМР (600 МГц, ДМСО- <i>d</i> 6) δ 9.60 (s, 1H(OH)), 8.88 (d, J = 3.8 Гц, 1H(6')), 8.46 (d, J = 8.0 Гц, 1H(3')), 8.32 (td, J = 7.8, 1.7 Гц, 1H(4')), 8.04 – 7.97 (m, 2H(4)), 7.93 – 7.87 (m, 1H(5')), 7.74 (dd, J = 7.4, 1.8 Гц, 1H(5)), 7.45 (d, J = 8.4 Гц, 1H(12)), 6.95 (d, J = 2.5 Гц, 1H(9)), 6.47 (dd, J = 8.3, 2.5 Гц, 1H(11)). ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 165.49 (C(6)), 159.40 (C(10)), 156.88 (C(2')), 153.91 (C(2)), 148.15 (C(6')), 144.82 (C(8)), 140.52 (C(4')), 139.37 (C(3)), 137.45 (C(7)), 128.11 (C(5')), 126.97 (C(12)), 123.72 (C(3')), 121.30 (C(9)), 118.26 (C(5)), 117.61 (C(4)), 110.67 (C(11)). ^{195}Pt ЯМР (129 МГц, ДМСО) δ -3464.04.	297(O-H), 3096(C-H _{Ar}), 1595(C-C _{Ar}), 1566, 1195(C-O)
2.2b		^1H ЯМР (600 МГц, ДМСО- <i>d</i> 6) δ 8.87 (d, J = 5.4 Гц, 1H(6')), 8.45 (d, J = 8.0 Гц, 1H(3')), 8.31 (t, J = 7.8 Гц, 1H(4')), 8.07 – 7.98 (m, 2H(3)), 7.88 (t, J = 6.5 Гц, 1H(5')), 7.83 – 7.75 (m, 1H(5)), 7.54 (d, J = 8.5 Гц, 1H(12)), 7.01 (d, J = 2.7 Гц, 1H(9)), 6.64 (dd, J = 8.4, 2.4 Гц, 1H(11)), 3.77 (s, 3H(I)). ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 165.02 (C(6)), 160.59 (C(10)), 156.81 (C(2')), 153.99 (C(2)), 148.21 (C(6')), 144.77 (C(8)), 140.46 (C(4')), 139.39 (C(3)), 139.21 (C(7)), 128.07 (C(5')), 126.61 (C(12)), 123.75 (C(3')), 118.90 (C(9)), 118.62 (C(5)), 118.14 (C(4)), 109.32 (C(11)), 54.90 (C(I)). ^{195}Pt ЯМР (129 МГц, ДМСО) δ -3459.59.	3062(C-H _{Ar}); 2985(C-H); 1600(C-C _{Ar}); 1588(C-C _{Ar}); 1246(C-O-C _{ассим}); 1033(C-O-C _{ссим})

№	Структурная формула	Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д., КССВ (J), Гц Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.	ИК-спектр, ν , см^{-1}
2.2c		^1H ЯМР (600 МГц, ДМСО- <i>d</i> 6) δ 8.83 (d, $J = 4.8$ Гц, 1H(6')), 8.41 (d, $J = 8.0$ Гц, 1H(3)), 8.28 (td, $J = 7.8, 1.6$ Гц, 1H(4')), 8.03 – 7.93 (m, 2H(3), (4)), 7.89 – 7.81 (m, 1H(5')), 7.72 (d, $J = 7.6$ Гц, 1H(5)), 7.48 (d, $J = 8.5$ Гц, 1H(12)), 6.96 (d, $J = 2.5$ Гц, 1H(9)), 6.59 (dd, $J = 8.5, 2.5$ Гц, 1H(11)), 4.03 (q, $J = 6.9$ Гц, 2H(I)), 1.34 (t, $J = 6.9$ Гц, 3H(II)). ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 165.02 (C(6)), 159.91 (C(10)), 156.80 (C(2')), 153.95 (C(2)), 148.17 (C(6')), 144.74 (C(8)), 140.42 (C(4')), 139.33 (C(3)), 139.02 (C(7)), 128.04 (C(5')), 126.61 (C(12)), 123.74 (C(3')), 119.40 (C(9)), 118.56 (C(5)), 118.08 (C(4)), 109.65 (C(11)), 62.77 (C(I)), 14.73 (C(II)). ^{195}Pt ЯМР (129 МГц, ДМСО) δ -3459.03.	3060(C-H _{Ar}), 2973(C-H), 1600(C-C _{Ar}), 1585(C-C _{Ar}), 1246(C-O-C _{ассим}), 1047(C-O-C _{ссим})
2.2d		^1H ЯМР (600 МГц, ДМСО- <i>d</i> 6) δ 8.86 (d, $J = 3.4$ Гц, 1H(6')), 8.44 (d, $J = 7.7$ Гц, 1H(3)), 8.30 (t, $J = 7.6$ Гц, 1H(4')), 8.01 (q, $J = 7.5$ Гц, 2H(3), (4)), 7.91 – 7.84 (m, 1H(5')), 7.77 (d, $J = 7.2$ Гц, 1H(5)), 7.52 (d, $J = 8.1$ Гц, 1H(12)), 6.99 (s, 1H(9)), 6.63 (d, $J = 7.8$ Гц, 1H(11)), 4.00 (t, $J = 5.7$ Гц, 2H(I)), 1.85 – 1.75 (m, 1H(III)), 1.62 (q, $J = 6.7$ Гц, 2H(II)), 0.95 (d, $J = 6.3$ Гц, 6H(IV), (V)). ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 165.09 (C(6)), 160.11 (C(10)), 156.82 (C(2')), 154.00 (C(2)), 148.24 (C(6')), 144.65 (C(8)), 140.51 (C(4')), 139.43 (C(3)), 139.06 (C(7)), 128.12 (C(5')), 126.68 (C(12)), 123.77 (C(3')), 119.63 (C(9)), 118.62 (C(5)), 118.11 (C(4)), 109.63 (C(11)), 65.56 (C(I)), 37.47 (C(II)), 24.58 (C(III)), 22.47 (C(IV)(V)). ^{195}Pt ЯМР (129 МГц, ДМСО) δ -3460.13.	3057(C-H _{Ar}), 2952(C-H), 1600(C-C _{Ar}), 1588(C-C _{Ar}), 1200(C-O-C _{ассим}), 1022(C-O-C _{ссим})

№	Структурная формула	Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д., КССВ (J), Гц Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.	ИК-спектр, ν , см^{-1}
2.2e		^1H ЯМР (600 МГц, CDCl_3) δ 8,85 (d, $J = 5.2$ Гц, 1H(6')), 7,92 (d, $J = 7.8$ Гц, 1H(3)), 7,77 (d, $J = 8.0$ Гц, 1H(4')), 7,5 (t, $J = 8.0$ Гц, 1H(3)), 7,46 (m, 1H(4)), 7,33 (d, $J = 8.0$ Гц, 1H(5')), 7,13 (m, 3H(12)(5)(9)), 6,57 (dd, $J = 8.4, 2.4$ Гц, 1H(11)), 3,94 (dd, $J = 5.6; 2.4$ Гц, 2H(I)), 1,74 (m, 1H(II)), 1,56-1,34 (m, 8H(III), (IV), (V), (VI)), 0,97-0,91 (m, 6H(VII), (VIII)). ^{13}C ЯМР (151 МГц, CDCl_3) δ 166,2 (C(6)); 161,4 (C(10)); 157,3 (C(2')); 153,9 (C(2)); 148,6 (C(6')); 144,9 (C(8)); 138,9 (C(4')); 138,4 (C(3)); 138,1 (C(7)); 126,8 (C(5')); 125,9 (C(12)); 122,4 (C(3')); 119,3 (C(9)); 117,7 (C(5)); 116,6 (C(4)); 110,9 (C(11)); 70,2 (C(I)); 39,5 (C(II)); 30,6 (C(III)); 29,2 (C(IV)); 23,9 (C(VIII)); 23,1 (C(V)); 14,2 (C(VIII)); 11,2 (C(VI)). . ^{195}Pt ЯМР (129 МГц, ДМСО) δ -3458,06.	3053 - 3064(C_{Ar}) 2856 - 2954 (C_{Alk}) 1094 (COC_{Ar}) 1581 (C=N)
2.2f		^1H ЯМР (600 МГц, ДМСО-d_6) δ 9.59 (s, 1H(OH)), 8.92 – 8.84 (m, 1H(6')), 8.69 (d, $J = 8.1$ Гц, 1H(3')), 8.38 – 8.29 (m, 2H(3), (4)), 8.09 – 8.02 (m, 2H(o-)), 7.95 (s, 1H(5)), 7.89 (ddd, $J = 7.6, 5.3, 1.2$ Гц, 1H(5')), 7.65 (d, $J = 8.4$ Гц, 1H(12)), 7.58 (d, $J = 7.7$ Гц, 2H(m-), (p-)), 6.95 (d, $J = 2.5$ Гц, 1H(9)), 6.48 (dd, $J = 8.4, 2.5$ Гц, 1H(11)). ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 165.54 (C(6)), 159.35 (C(10)), 156.92 (C(2')), 154.18 (C(4)), 150.30 (C(i-)), 148.09 (C(6')), 144.81 (C(8)), 140.34 (C(4')), 137.58 (C(7)), 136.45 (C(2)), 130.15 (C(p-)), 129.09 (C(m-)), 128.09 (C(5')), 127.45 (C(o-)), 127.31 (C(12)), 124.05 (C(3')), 121.26 (C(9)), 115.34 (C(3)), 115.26 (C(5)), 110.61 (C(11)). ^{195}Pt ЯМР (129 МГц, ДМСО) δ -3430.77.	3283(O-H), 3055(C-H_{Ar}), 1601(C-C_{Ar})

№	Структурная формула	Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д., КССВ (J), Гц Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.	ИК-спектр, ν , см^{-1}
2.2g		^1H ЯМР (600 МГц, ДМСО-<i>d</i>6) δ 8.82 (d, $J = 5.3$ Гц, 1H(6)), 8.66 (d, $J = 8.0$ Гц, 1H(3')), 8.35 (s, 1H(3)), 8.33 – 8.29 (m, 1H(4)), 8.08 – 8.02 (m, 3H(<i>o</i>-), (5)), 7.84 (t, $J = 6.5$ Гц, 1H(5')), 7.70 (d, $J = 8.5$ Гц, 1H(12)), 7.58 (d, $J = 6.9$ Гц, 3H(<i>m</i>-), (<i>p</i>-)), 6.96 (d, $J = 2.6$ Гц, 1H(9)), 6.62 (dd, $J = 8.5, 2.6$ Гц, 1H(11)), 3.73 (s, 3H(I)). ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 165.08 (C(6')), 160.51 (C(10)), 156.89 (C(2')), 154.24 (C(4)), 150.30 (C(<i>i</i>-)), 148.13 (C(6')), 144.72 (C(8)), 140.28 (C(4)), 139.32 (C(7)), 136.40 (C(2)), 130.16 (C(<i>p</i>-)), 129.06 (C(<i>m</i>-)), 128.03 (C(5')), 127.49 (C(<i>o</i>-)), 126.93 (C(12)), 124.10 (C(3')), 118.85 (C(9)), 115.87 (C(3)), 115.64 (C(5)), 109.25 (C(11)), 54.83 (I)). ^{195}Pt ЯМР (129 МГц, ДМСО) δ -3427.41.	3053(C-H_{Ar}), 2934(C-H), 1606(C-C_{Ar}), 1584(C-C_{Ar}), 1223(C-O-C_{ассим}), 1037(C-O-C_{ссим})
2.2h		^1H ЯМР (600 МГц, хлороформ-<i>d</i>) δ 8.60 (d, $J = 4.4$ Гц, 1H(6')), 7.82 (td, $J = 7.7, 1.6$ Гц, 1H(3')), 7.77 (d, $J = 7.9$ Гц, 1H(4')), 7.69 – 7.63 (m, 2H(<i>m</i>-)), 7.51 – 7.44 (m, 3H(<i>p</i>-), (<i>o</i>-)), 7.37 (d, $J = 1.1$ Гц, 1H(3)), 7.21 (ddd, $J = 7.0, 5.2, 1.3$ Гц, 1H(5')), 7.10 (d, $J = 1.1$ Гц, 1H(5)), 7.03 (d, $J = 8.4$ Гц, 1H(12)), 6.90 (d, $J = 2.5$ Гц, 1H(9)), 6.44 (dd, $J = 8.4, 2.6$ Гц, 1H(11)), 3.72 – 3.63 (m, 2H(I)), 1.64 (h, $J = 6.0$ Гц, 1H(II)), 1.52 – 1.28 (m, 8H(IV), (V), (III), (VII)), 0.99 – 0.87 (m, 6H(VI), (VIII)). ^{13}C ЯМР (151 МГц, CDCl₃) δ 166.04 (C(6)), 161.31 (C(10)), 157.42 (C(2')), 154.10 (C(4)), 150.76 (C(<i>i</i>-)), 148.73 (C(6')), 144.99 (C(8)), 138.83 (C(4')), 138.51 (C(7)), 137.75 (C(2)), 129.95 (C(<i>p</i>-)), 129.37 (C(<i>m</i>-)), 127.28 (C(5')), 126.79 (C(<i>o</i>-)), 125.84 (C(12)), 122.63 (C(3')), 119.36 (C(9)), 115.72 (C(3)), 115.32 (C(5)), 111.01 (C(11)), 70.23	3095(C-H_{Ar}), 2957(C-H), 1611(C-C_{Ar}), 1582(C-C_{Ar}), 1220(C-O-C_{ассим}), 1021(C-O-C_{ссим})

№	Структурная формула	Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д., КССВ (J), Гц Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.	ИК-спектр, ν , см $^{-1}$
		(C(I)), 39.63 (C(II)), 30.69 (C(III)), 29.34 (C(IV)), 24.00 (C(VIII)), 23.26 (C(V)), 14.31 (C(VIII)), 11.40 (C(VI)). ^{195}Pt ЯМР (129 МГц, CDCl_3) δ -3428.10.	
2.3a		^1H ЯМР (600 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, 25°C, ppm) δ =9.13 (d, J = 5.1 Гц, 1H; H(1)), 8.85 (d, J = 8.0 Гц, 1H; H(4)), 8.53 (dd, J = 5.9, 3.0 Гц, 1H; H(7)), 8.48 (t, J = 7.9 Гц, 1H; H(3)), 8.38 – 8.32 (m, 2H; H(12, 8)), 8.07 (t, J = 6.2 Гц, 1H; H(2)), 7.96 (d, J = 8.6 Гц, 1H; H(9)), 7.12 (d, J = 2.5 Гц, 1H; H(15)), 6.92 (dd, J = 8.6, 2.5 Гц, 1H; H(13)), 3.89 (s, 3H; H(I)); ^{13}C ЯМР (151 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, 25°C, ppm) δ =161.27 (C(10)), 161.10 (C(14)), 154.57 (C(5)), 150.76 (C(6)), 148.45 (C(1)), 143.23 (C(8)), 142.00 (C(3)), 136.10 (C(16)), 135.79 (C(11)), 129.06 (C(9)), 128.79 (C(2)), 125.81 (C(4)), 121.89 (C(8)), 121.26 (C(7)), 117.19 (C(15)), 111.83 (C(13)), 55.70 (C(I)); ^{195}Pt ЯМР (129 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, 25°C, ppm) δ = -1159.46.	3071, 3032 (C-H _{Ar}); 2996, 2983, 2833, 2912 (C-H); 1589, 1548 (C-C _{Ar}); 1471, 1449, 1428, 1390, 1334, 1300, 1268 (C-H); 1229, 1208 (C-O-C _{ассим}); 1096, 1020 (C-O-C _{ссим}); 806, 772, 588 (C-H _{Ar})

№	Структурная формула	Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д., КССВ (J), Гц Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.	ИК-спектр, ν , см^{-1}
2.3b		^1H ЯМР (600 МГц, ДМСО-<i>d</i>6) δ 9.12 (dd, $J = 4.4, 0.8$ Гц, 1H; H(1)), 8.85 (d, $J = 8.0$ Гц, 1H; H(4)), 8.52 (dt, $J = 8.2, 4.1$ Гц, 1H; H(7)), 8.48 (td, $J = 7.9, 1.6$ Гц, 1H; H(3)), 8.38 – 8.32 (m, 2H; H(12, 8)), 8.07 (dt, $J = 7.7, 1.1$ Гц, 1H; H(2)), 7.94 (d, $J = 8.7$ Гц, 1H; H(9)), 7.10 (d, $J = 2.5$ Гц, 1H; H(15)), 6.92 (dd, $J = 8.6, 2.5$ Гц, 1H; H(13)), 4.05 – 3.96 (m, 2H; H(I)), 1.75 (q, $J = 6.1$ Гц, 1H; H(II)), 1.55 – 1.37 (m, 4H; H(III, V)), 1.37 – 1.27 (m, 4H; H(VI, VII)), 0.93 (t, $J = 7.5$ Гц, 3H; H(IV)), 0.90 (t, $J = 7.1$ Гц, 3H; H(VIII)); ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 161.11 (C(10)), 160.92 (C(14)), 154.58 (C(5)), 150.75 (C(6)), 148.44 (C(1)), 143.22 (C(8)), 142.00 (C(3)), 135.96 (C(16)), 135.68 (C(11)), 129.05 (C(9)), 128.86 (C(2)), 125.81 (C(4)), 121.86 (C(8)), 121.23 (C(7)), 117.94 (C(15)), 111.87 (C(13)), 70.31 (C(I)), 29.94 (C(II)), 28.52 (C(V)), 23.33 (C(VI)), 22.52 (C(III)), 13.99 (C(VII)), 11.01 (C(IV)); ^{195}Pt ЯМР (129 МГц, ДМСО-<i>d</i>6) δ -1157.16.	3073(C-H_{Ar}); 2925 (C-H); 1588(C-C_{Ar}); 1552(C-C_{Ar}); 1210(C-O-C_{ассим}); 1021(C-O-C_{сим})

3.14. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных была проведена в программе RStudio (Version 2024.12.1 build 563 © 2009-2024 Posit Software, PBC) на языке программирования R (version 4.5.0). Индекс цитотоксичности (IC₅₀) рассчитывали с построением кривых доза-эффект с помощью пакета «drc» [141]. Во всех случаях статистической обработки, если группы имели нормальное распределение и гомогенную дисперсию, проводили дисперсионный анализ (ANOVA), для попарного сравнение групп использовали тест Тьюки. При отсутствии гомогенной дисперсии проводили дисперсионный анализ с поправкой на неравные дисперсии, для попарного сравнение групп использовали тест Уэлча с поправкой на множественность Холма. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

3.15. Обработка изображений

Обработку фотографий, полученных после микроскопии, для наложения слоев изображений клеток, сделанных при разных каналах флуоресценции и удаления фона, осуществляли в программе RStudio (Version 2024.12.1 build 563 © 2009-2024 Posit Software, PBC) на языке программирования R (version 4.5.0), с использованием пакета «imager». В некоторых случаях, обработку фотографий, полученных после микроскопии, для наложения слоев изображений клеток, сделанных при разных каналах флуоресценции и удаления фона, осуществляли в программе ImageJ (версия 1.53t).

Потенциал митохондриальной мембраны и перекисное окисление липидного слоя мембран митохондрий изучали путем подсчета и соотношения интенсивности пикселей красного и зеленого свечения по микрофотографиям, оценку пролиферативной активности основывали на подсчете и соотношении количества клеток с голубой и красной флуоресценцией, в программе RStudio (Version 2024.12.1 build 563 © 2009-2024 Posit Software, PBC) на языке программирования R (version 4.5.0), с помощью пакета «EBImage».

Для обработки изображений, полученных в результате вестерн-блоттинга, использовали программу ImageJ (версия 1.53t) для оценки интенсивности бэндов и язык программирования R (version 4.5.0) в среде разработки RStudio (Version 2024.12.1 build 563 © 2009-2024 Posit Software, PBC).

Для создания коллажей изображений во всех случаях использовали язык программирования Julia (version 1.11) в программе Visual Studio Code (version 1.116.0)

3.16. Реакция с глутатионом

Спектры ЯМР ¹H, ¹³C и ¹⁹⁵Pt записаны в растворах ДМСО-d₆ и DMF-d₇ на спектрометре Bruker AVANCE NEO (600 МГц для ¹H, 151 МГц для ¹³C и 129 МГц для ¹⁹⁵Pt). Химические сдвиги в спектрах ЯМР ¹H приведены относительно остаточного сигнала

(CHD₂)CD₃SO (δ_{H} 2.50 м.д.) для растворов в ДМСО-d₆, остаточного сигнала (CD₃)NCOH (δ_{H} 8.03 м.д.) для растворов в DMF-d₇. Химические сдвиги в спектрах ЯМР ¹³C приведены относительно центрального сигнала растворителя (δ_{C} 39.52 м.д. для растворов в ДМСО-d₆).

В качестве объектов для исследования были выбраны соединения **2.2e** (для линейки Pt(II) соединений) и **2.3b**. Навеску платинового комплекса растворяли в 0,5 мл соответствующего дейтерированного растворителя, после чего добавляли GSH в 0,05 мл D₂O. Спектры ¹H ЯМР регистрировали через каждые 214 секунд от начала реакции при температуре 298 К.

3.17. Рентгеноструктурный анализ

Рентгеноструктурный анализ выполнен с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Спектроскопия и анализ органических соединений» Института органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук. Эксперимент проведен на автоматическом рентгеновском дифрактометре «Xcalibur 3» с CCD-детектором по стандартной методике (MoK α -излучение, графитовый монохроматор, ω -сканирование с шагом 1° при T = 295(2) К). Эмпирическая поправка на поглощение была учтена. Структура расшифрована с использованием комплекса программ Olex2 [142]: решение выполнено методом Charge Flipping с применением программы olex2.solve, уточнение проведено методом наименьших квадратов по Гауссу-Ньютону в пакете olex2.refine [143]. Атомы водорода при атомах углерода размещены в геометрически рассчитанных позициях и уточнены по модели «наездника».

Кристаллографические данные для C₁₈H₁₄Cl₆N₂OPt (M = 682.118 г/моль): моноклинная сингония, пространственная группа P2₁/n, параметры ячейки: a = 9.1736(2) Å, b = 15.5290(3) Å, c = 15.4578(4) Å, β = 102.281(2)°, V = 2151.69(9) Å³, Z = 4, T = 295(2) К, $\mu(\text{MoK}\alpha) = 7.277 \text{ мм}^{-1}$, D_{выч} = 2.106 г/см³. Измерено 10183 отражений (4.76° ≤ 2 θ ≤ 62.42°), из них 5857 независимых (R_{int} = 0.0272, R_{sigma} = 0.0523) использованы во всех расчетах. Финальные факторы расхожимости: R₁ = 0.0351, wR₂ = 0.0584 (для отражений с I > 2 σ (I)) и R₁ = 0.0598, wR₂ = 0.0670 (по всем данным). GooF = 1.011. Остаточная электронная плотность: максимум/минимум 1.21/-1.05 е⁻/Å³.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной диссертационной работы было проведено исследование противоопухолевой активности серии комплексов платины и получены следующие результаты:

1. Из серии хлорплатиновых(II) комплексов арилбипиридинов одно соединение – хлорплатинат(II) 6-(4-(2-этилгексил)оксиифенил)-2,2'-бипиридина – обладает выраженным противоопухолевым действием и некоторой селективностью, превышающей цисплатин.

2. Установлена неапоптотическая природа индуцированной клеточной смерти клеток ЗНО под действием хлорплатинат(II) 6-(4-(2-этилгексил)оксиифенил)-2,2'-бипиридина, вызванная окислительным стрессом. Подтверждено, что ДНК не является основной мишенью изученного соединения, в отличие от классических препаратов платины, находящихся в применении и на стадиях клинических испытаний.

3. Впервые показана способность комплекса платины(II) индуцировать ферроптоз через блокировку глутатиона и ингибирование антиоксидантной системы защиты клетки.

4. Описан синтез пролекарства – комплекса платины(IV) на основе определённого соединения-лидера комплекса платины(II) и описана его цитотоксическая активность в разы превышающая предшественник.

5. Установлен и описан механизм разработанного потенциального пролекарства, заключающийся в индукции ферроптоза из-за блокировки глутатиона через предварительное восстановление Pt(IV) до Pt(II) посредством GSH с его переходом в окисленную форму, не вступающую в дальнейшую реакцию с Pt(II).

Перспективы дальнейшей разработки темы включают в себя исследования на моделях *in vivo*, а также изучение преодоления резистентности при комбинированном использовании препаратов платины, таких как цисплатин, и соединений, описанных в диссертации, так как глутатион, являющийся основной мишенью описанных веществ, является одним из центральных звеньев механизма приобретения клетками ЗНО резистентности к терапии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Каприн, А. Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2024 году / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова. – Москва : МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2025. – 275 с.
2. Parums, D. V. Recently Identified Global Trends in Cancer Incidence and Mortality and Modifiable Cancer Risk Factors / D. V. Parums // Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research. – 2026. – Vol. 32. – P. e953221.
3. Abbas, Z. An overview of cancer treatment modalities / Z. Abbas, S. Rehman // Neoplasms. – 2018. – Vol. 1. – P. 139-157.
4. Anderson, P. O. Cancer chemotherapy / P. O. Anderson // Breastfeeding Medicine. – 2016. – Vol. 11, no. 4. – P. 164-165.
5. Тюляндин, С. А. Нерешенные проблемы и перспективы лекарственного лечения / С. А. Тюляндин, О. А. Кузнецова // Практическая онкология. – 2024. – т. 25, вып. 4. – С. 303-312.
6. Kathare, J. Systemic toxicity profile of chemotherapeutic agents in a Wistar rat model: a preliminary report / J. Kathare, J. Mbaria, C. Kaluwa [et al.] // Journal of Toxicology. – 2025. – Vol. 2025, no. 1. – P. 8811238.
7. Nyrop, K. A. Patient-reported toxicities during chemotherapy regimens in current clinical practice for early breast cancer / K. A. Nyrop, A. M. Deal, S. S. Shachar [et al.] // The Oncologist. – 2019. – Vol. 24, no. 6. – P. 762-771.
8. Волков, Н. М. Резистентность к химиотерапии — исчерпаны ли возможности? / Н. М. Волков // Практическая онкология. – 2021. – т. 22, вып. 2. – С. 99-109.
9. Окладникова, Е. В. Молекулярные механизмы лекарственной устойчивости опухолей / Е. В. Окладникова, И. С. Зинченко, Т. Г. Рукша // Молекулярная медицина. – 2023. – т. 21, вып. 2. – С. 3-10.
10. Zhang, C. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies / C. Zhang, C. Xu, X. Gao [et al.] // Theranostics. – 2022. – Vol. 12, no. 5. – P. 2115.
11. Rosenberg, B. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode / B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas // Nature. – 1965. – Vol. 205, no. 4972. – P. 698-699.
12. Dasari, S. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action / S. Dasari, P. B. Tchounwou // European Journal of Pharmacology. – 2014. – Vol. 740. – P. 364-378.

13. Petrović, M. Biochemical and molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer cells / M. Petrović, D. Todorović // *Facta Universitatis, Series: Medicine and Biology*. – 2016. – P. 12-18.
14. Yang, X. L. Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA / X. L. Yang, A. H. J. Wang // *Pharmacology & Therapeutics*. – 1999. – Vol. 83, no. 3. – P. 181-215.
15. Алексеев, Г. В. Сравнение влияния карбоплатина и цисплатина на структуру молекулы ДНК в растворе / Г. В. Алексеев, Н. А. Касьяненко // *Вестник Санкт-Петербургского университета. Физика. Химия*. – 2018. – т. 5, вып. 1. – С. 4-12.
16. Culy, C. R. Oxaliplatin: a review of its pharmacological properties and clinical efficacy in metastatic colorectal cancer and its potential in other malignancies / C. R. Culy, D. Clemett, L. R. Wiseman // *Drugs*. – 2000. – Vol. 60, no. 4. – P. 895-924.
17. Shimada, M. Nedaplatin: a cisplatin derivative in cancer chemotherapy / M. Shimada, H. Itamochi, J. Kigawa // *Cancer Management and Research*. – 2013. – P. 67-76.
18. Choy, H. Current status and future prospects for satraplatin, an oral platinum analogue / H. Choy, C. Park, M. Yao // *Clinical Cancer Research*. – 2008. – Vol. 14, no. 6. – P. 1633-1638.
19. Cullen, K. J. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer / K. J. Cullen, Z. Yang, L. Schumaker [et al.] // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. – 2007. – Vol. 39, no. 1. – P. 43-50.
20. Щукина, К. М. Изменение уровня АФК в клетках HeLa Kyoto на разных стадиях цисплатин-индуцированной клеточной гибели / К. М. Щукина, А. С. Неруш, А. Г. Орлова // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. – 2018. – т. 3, вып. 4. – С. 699-705.
21. Rebillard, A. Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells / A. Rebillard, X. Tekpli, O. Meurette [et al.] // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, no. 16. – P. 7865-7874.
22. Dabrowiak, J. C. *Metals in medicine* / J. C. Dabrowiak. – Hoboken : John Wiley & Sons, 2017. – 480 p.
23. Raudenska, M. Unexpected therapeutic effects of cisplatin / M. Raudenska, J. Balva, M. Fojtu [et al.] // *Metallomics*. – 2019. – Vol. 11, no. 7. – P. 1182-1199.
24. Mandic, A. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling / A. Mandic, J. Hansson, S. Linder [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, no. 11. – P. 9100-9106.

25. Jordan, P. Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA in vivo / P. Jordan, M. Carmo-Fonseca // *Nucleic Acids Research*. – 1998. – Vol. 26, no. 12. – P. 2831-2836.
26. Hostetter, A. A. RNA-Pt adducts following cisplatin treatment of *Saccharomyces cerevisiae* / A. A. Hostetter, M. F. Osborn, V. J. DeRose // *ACS Chemical Biology*. – 2012. – Vol. 7, no. 1. – P. 218-225.
27. Reed, J. C. Mechanisms of apoptosis / J. C. Reed // *The American Journal of Pathology*. – 2000. – Vol. 157, no. 5. – P. 1415-1430.
28. Лаврик, И. Н. Апоптоз: заказное самоубийство / И. Н. Лаврик // *Наука из первых рук*. – 2013. – т. 4, вып. 52. – С. 52-57.
29. Fernald, K. Evading apoptosis in cancer / K. Fernald, M. Kurokawa // *Trends in Cell Biology*. – 2013. – Vol. 23, no. 12. – P. 620-633.
30. Carneiro, B. A. Targeting apoptosis in cancer therapy / B. A. Carneiro, W. S. El-Deiry // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2020. – Vol. 17, no. 7. – P. 395-417.
31. Tsuruo, T. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal / T. Tsuruo, M. Naito, A. Tomida [et al.] // *Cancer Science*. – 2003. – Vol. 94, no. 1. – P. 15-21.
32. Brabec, V. Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs / V. Brabec, J. Kasparkova // *Drug Resistance Updates*. – 2002. – Vol. 5, no. 3-4. – P. 147-161.
33. Rybak, L. P. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention / L. P. Rybak, C. A. Whitworth, D. Mukherjee [et al.] // *Hearing Research*. – 2007. – Vol. 226, no. 1-2. – P. 157-167.
34. Huang, J. Ligand evolution in the photoactivatable platinum (IV) anticancer prodrugs / J. Huang, W. Ding, X. Zhu [et al.] // *Frontiers in Chemistry*. – 2022. – Vol. 10. – P. 876410.
35. Ivanova, S. Comparative assessment of clinical trials, indications, pharmacokinetic parameters and side effects of approved platinum drugs / S. Ivanova // *Pharmacia*. – 2022. – Vol. 69. – P. 1-7.
36. Yusoh, N. A. Advances in platinum-based cancer therapy: overcoming platinum resistance through rational combinatorial strategies / N. A. Yusoh, H. Ahmad, K. A. Vallis [et al.] // *Medical Oncology*. – 2025. – Vol. 42, no. 7. – P. 262.
37. Borst, P. How do real tumors become resistant to cisplatin? / P. Borst, S. Rottenberg, J. Jonkers // *Cell Cycle*. – 2008. – Vol. 7, no. 10. – P. 1353-1359.
38. Kartalou, M. Mechanisms of resistance to cisplatin / M. Kartalou, J. M. Essigmann // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2001. – Vol. 478, no. 1-2. – P. 23-43.

39. Stewart, D. J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin / D. J. Stewart // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2007. – Vol. 63, no. 1. – P. 12-31.
40. Chen, H. H. W. Role of glutathione in the regulation of cisplatin resistance in cancer chemotherapy / H. H. W. Chen, M. T. Kuo // *Metal-Based Drugs*. – 2010. – Vol. 2010, no. 1. – P. 430939.
41. Berners-Price, S. J. Reaction of cis-and trans-[PtCl₂ (NH₃)₂] with reduced glutathione inside human red blood cells, studied by ¹H and ¹⁵N-{¹H} DEPT ЯMP / S. J. Berners-Price, P. W. Kuchel // *Journal of inorganic biochemistry*. – 1990. – Vol. 38, no. 4. – P. 327-345
42. Wexselblatt, E. What do we know about the reduction of Pt (IV) pro-drugs? / E. Wexselblatt, D. Gibson // *Journal of inorganic biochemistry*. – 2012. – Vol. 117. – P. 220-229.
43. Johnstone, T. C. The next generation of platinum drugs: targeted Pt (II) agents, nanoparticle delivery, and Pt (IV) prodrugs / T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, S. J. Lippard // *Chemical reviews*. – 2016. – Vol. 116, no. 5. – P. 3436-3486.
44. O'Rourke, T. J. Phase I clinical trial of ormaplatin (tetraplatin, NSC 363812) / T. J. O'Rourke, G. R. Weiss, P. New [et al.] // *Anti-Cancer Drugs*. – 1994. – Vol. 5, no. 5. – P. 520-526
45. Schilder, R. J. Phase I and pharmacokinetic study of ormaplatin (tetraplatin, NSC 363812) administered on a day 1 and day 8 schedule / R. J. Schilder, F. P. LaCreta, R. P. Perez [et al.] // *Cancer research*. – 1994. – Vol. 54, no. 3. – P. 709-717.
46. Mi, Q. Current status for oral platinum (IV) anticancer drug development / Q. Mi, J. Pei, Y. Wang [et al.] // *Int. J. Med. Phys. Clin. Eng. Radiat. Oncol.* – 2018. – Vol. 7, no. 02. – P. 231.
47. Doshi, G. Clinical and pharmacokinetic evaluation of satraplatin / G. Doshi, G. Sonpavde, C. N. Sternberg // *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. – 2012. – Vol. 8, no. 1. – P. 103-111.
48. Horváth, V. Different cell cycle modulation following treatment of human ovarian carcinoma cells with a new platinum (IV) complex vs cisplatin / V. Horváth, O. Szabó, E. Sági [et al.] // *Investigational New Drugs*. – 2007. – Vol. 25, no. 5. – P. 435-443.
49. Apps, M. G. The state-of-play and future of platinum drugs / M. G. Apps, E. H. Y. Choi, N. J. Wheate // *Endocrine-related research*. – 2015. – P. 219-233.
50. Silva, M. M. The balance between NRF2/GSH antioxidant mediated pathway and DNA repair modulates cisplatin resistance in lung cancer cells / M. M. Silva, C. R. R. Rocha, L. K. K. V. Kato [et al.] // *Scientific reports*. – 2019. – Vol. 9, no. 1. – P. 17639.
51. Hannon Barroeta, P. The role of the Nrf2/GSH antioxidant system in cisplatin resistance in malignant rhabdoid tumours / P. Hannon Barroeta, M. J. O'Sullivan, D. M. Zisterer // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2023. – Vol. 149, no. 11. – P. 8379-8391.

52. Zhang, J. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance / J. Zhang, M. F. G. Stevens, T. D. Bradshaw // *Current molecular pharmacology*. – 2012. – Vol. 5, no. 1. – P. 102-114.
53. Rocha, C. R. R. Glutathione depletion sensitizes cisplatin-and temozolomide-resistant glioma cells in vitro and in vivo / C. R. R. Rocha, C. C. L. S. Silva, L. K. K. V. Kato [et al.] // *Cell death & disease*. – 2014. – Vol. 5, no. 10. – P. e1505-e1505.
54. Rocha, C. R. R. NRF2 and glutathione are key resistance mediators to temozolomide in glioma and melanoma cells / C. R. R. Rocha, L. K. K. V. Kato, L. M. B. P. de Oliveira [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, no. 30. – P. 48081.
55. Choi, B. Shadows of NRF2 in cancer: Resistance to chemotherapy / B. Choi, M. K. Kwak // *Current Opinion in Toxicology*. – 2016. – Vol. 1. – P. 20-28.
56. Bowden, N. A. Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? / N. A. Bowden // *Cancer letters*. – 2014. – Vol. 346, no. 2. – P. 163-171.
57. Duan, M. Role of nucleotide excision repair in cisplatin resistance / M. Duan, J. Ulibarri, L. Liu [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Vol. 21, no. 23. – P. 9248.
58. Kilari, D. Role of copper transporters in platinum resistance / D. Kilari, E. Guancial, E. S. Kim // *World journal of clinical oncology*. – 2016. – Vol. 7, no. 1. – P. 106.
59. Koike, K. A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells / K. Koike, T. Kawabe, T. Tanaka [et al.] // *Cancer research*. – 1997. – Vol. 57, no. 24. – P. 5475-5479.
60. Yang, X. Resistance to chemotherapy-induced apoptosis via decreased caspase-3 activity and overexpression of antiapoptotic proteins in ovarian cancer / X. Yang, C. M. Fraser, M. A. Basu [et al.] // *Journal of cancer research and clinical oncology*. – 2004. – Vol. 130, no. 7. – P. 423-428.
61. Dixon, S. J. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death / S. J. Dixon, K. M. Lemberg, M. R. Lamprecht [et al.] // *cell*. – 2012. – Vol. 149, no. 5. – P. 1060-1072.
62. Degterev, A. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury / A. Degterev, Z. Huang, M. Boyce [et al.] // *Nature chemical biology*. – 2005. – Vol. 1, no. 2. – P. 112-119.
63. Yan, G. E. Multiple cell death modalities and their key features / G. E. Yan, M. Elbadawi, T. Efferth // *World Academy of Sciences Journal*. – 2020. – Vol. 2, no. 2. – P. 39-48.

64. Wang, X. Non-apoptotic cell death-based cancer therapy: Molecular mechanism, pharmacological modulators, and nanomedicine / X. Wang, D. Liu, Z. Zhou [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2022. – Vol. 12, no. 9. – P. 3567-3593.
65. Lopus, M. Non-apoptotic cell death mechanisms and their therapeutic significance / M. Lopus, J. S. D'Souza, R. Aneja // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – Vol. 10. – P. 990285.
66. Dhuriya, Y. K. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death / Y. K. Dhuriya, D. Sharma // *Journal of neuroinflammation*. – 2018. – Vol. 15. – P. 1-9.
67. Wu, D. a New Breakthrough in Cancer Treatment. *Front* / D. Wu, Z. Wang, Y. Zhang [et al.] // *Oncology*. – 2021. – Vol. 11, no. 698811. – P. 10.3389.
68. Weerasinghe, P. Oncosis: an important non-apoptotic mode of cell death / P. Weerasinghe, L. M. Buja // *Experimental and molecular pathology*. – 2012. – Vol. 93, no. 3. – P. 302-308.
69. Дятлова, А. С. Молекулярные маркеры каспаза-зависимого и митохондриального апоптоза: роль в развитии патологии и в процессах клеточного старения / А. С. Дятлова, А. В. Дудков, Н. С. Линькова [и др.] // *Успехи современной биологии*. – 2018. – Т. 138, № 2. – С. 126-137.
70. Tchounwou, P. B. Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy / P. B. Tchounwou, S. Dasari, F. K. Noubissi, [et al.] // *Journal of experimental pharmacology*. – 2021. – P. 303-328.
71. Paul, I. Acquired differential regulation of caspase-8 in cisplatin-resistant non-small-cell lung cancer / I. Paul, A. D. Chacko, I. Stasik, [et al.] // *Cell death & disease*. – 2012. – Vol. 3, no. 12. – P. e449.
72. Yuan, J. A guide to cell death pathways / J. Yuan, D. Ofengeim // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2024. – Vol. 25, no. 5. – P. 379-395.
73. Тохтуева, М. Д. Ключевые маркеры ферроптоза / М. Д. Тохтуева, В. В. Мелехин // *Молекулярная медицина*. – 2024. – Т. 22, № 4. – С. 18-27.
74. Fan, R. A platinum (IV)–artesunate complex triggers ferroptosis by boosting cytoplasmic and mitochondrial lipid peroxidation to enhance tumor immunotherapy / R. Fan, A. Deng, R. Lin [et al.] // *MedComm*. – 2024. – Vol. 5, no. 6. – P. e570.
75. Gong, Y. The role of necroptosis in cancer biology and therapy / Y. Gong, Z. Fan, G. Luo [et al.] // *Molecular cancer*. – 2019. – Vol. 18, no. 1. – P. 100.
76. Suntharalingam, K. A platinum complex that binds non-covalently to DNA and induces cell death via a different mechanism than cisplatin / K. Suntharalingam, O. Mendoza, A. A. Duarte [et al.] // *Metallomics*. – 2013. – Vol. 5, no. 5. – P. 514-523.

77. Шляпина, В. Л. На распутье: механизмы апоптоза и аутофагии в жизни и смерти клетки / В. Л. Шляпина, С. В. Юртаева, М. П. Рубцова [и др.] // *Acta Naturae* (русскаяязычная версия). – 2021. – Т. 13, № 2. – С. 106-115.
78. Ху, J. Is autophagy always a barrier to cisplatin therapy? / J. Ху, D. A. Gewirtz // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12, no. 3. – P. 463.
79. Guo, W. J. Novel monofunctional platinum (II) complex Mono-Pt induces apoptosis-independent autophagic cell death in human ovarian carcinoma cells, distinct from cisplatin / W. J. Guo, Y. M. Zhang, L. Zhang [et al.] // *Autophagy*. – 2013. – Vol. 9, no. 7. – P. 996-1008.
80. Wang, F. Y. Mitochondria-targeted platinum (II) complexes induce apoptosis-dependent autophagic cell death mediated by ER-stress in A549 cancer cells / F. Y. Wang, X. M. Tang, X. Wang [et al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 155. – P. 639-650.
81. Wang, F. Y. New Platinum (II) agent induces bimodal death of apoptosis and autophagy against A549 cancer cell / F. Y. Wang, K. B. Huang, H. W. Feng [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 129. – P. 418-429.
82. Chen, S. Beyond apoptosis: platinum phototherapeutics overcome resistance by triggering diverse cell death pathways / S. Chen, Z. Wang, G. Zhu // *Chemical Communications*. – 2026.
83. Guo, Y. Amlexanox-modified platinum(IV) complex triggers apoptotic and autophagic bimodal death of cancer cells / Y. Guo, S. Jin, D. Song [et al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2022. – Vol. 242. – P. 114691.
84. Xu, C. C. Paraptosis: a non-classical paradigm of cell death for cancer therapy / C. C. Xu, Y. F. Lin, M. Y. Huang [et al.] // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2024. – Vol. 45, no. 2. – P. 223-237.
85. Gadre, S. A Rationally Designed Bimetallic Platinum (II)-Ferrocene Antitumor Agent Induces Non-Apoptotic Cell Death and Exerts in Vivo Efficacy / S. Gadre, M. Manikandan, P. Duari [et al.] // *Chemistry – A European Journal*. – 2022. – Vol. 28, no. 46. – P. e202201259.
86. Воробьева, Н. В. НЕТоз: молекулярные механизмы, роль в физиологии и патологии / Н. В. Воробьева, Б. В. Черняк // *Биохимия*. – 2020. – Т. 85, № 10. – С. 1383-1397.
87. Деев, Р. В. Современные представления о клеточной гибели / Р. В. Деев, А. И. Билялов, Т. М. Жампеисов // *Гены и клетки*. – 2018. – Т. 13, № 1. – С. 6-19.
88. Lempers, E. L. M. Reactions of [PtCl (dien)] Cl with glutathione, oxidized glutathione and S-methyl glutathione. Formation of an S-bridged dinuclear unit / E. L. M.

Lempers, K. Inagaki, J. Reedijk // *Inorganica chimica acta*. – 1988. – Vol. 152, no. 3. – P. 201-207.

89. Jansen, B. A. J. Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs / B. A. J. Jansen, J. Brouwer, J. Reedijk // *Journal of inorganic biochemistry*. – 2002. – Vol. 89, no. 3-4. – P. 197-202.

90. Jiang, X. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease / X. Jiang, B. R. Stockwell, M. Conrad // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2021. – Vol. 22, no. 4. – P. 266-282.

91. Abramov, V. M. Synthesis of derivatives of 6-aryl-2,2'-bipyridine complexes with PtII as potential antitumor agents / V. M. Abramov, L. A. Cheremnykh, O. S. El'tsov, [et al.] // *Russian Chemical Bulletin*. – 2023. – Vol. 72, no. 12. – P. 2848-2859.

92. Suleymanova, A. F. Measuring Self-Association of Pt Complexes by ^{195}Pt ЯМР / A. F. Suleymanova, O. S. El'tsov, D. N. Kozhevnikov [et al.] // *ChemistrySelect*. – 2017. – Vol. 2, no. 11. – P. 3353-3355.

93. Suleymanova, A. F. Comparative analysis of self-aggregation of liquid crystalline Pt (II) complexes in solution and in neat films / A. F. Suleymanova, O. S. El'tsov, D. N. Kozhevnikov [et al.] // *Journal of Organometallic Chemistry*. – 2021. – Vol. 938. – P. 121750.

94. Evstigneev, M. P. Tuning the aggregation of $\text{N}^{\wedge}\text{N}^{\wedge}\text{C}$ Pt (II) complexes by varying the aliphatic side chain and auxiliary halide ligand: ^1H and ^{195}Pt ЯМР investigation / M. P. Evstigneev, A. O. Lantushenko, Y. A. Yakovleva [et al.] // *European Journal of Inorganic Chemistry*. – 2019. – Vol. 2019, no. 38. – P. 4122-4128.

95. Basnet, A. 2,4,6-Trisubstituted pyridines: Synthesis, topoisomerase I and II inhibitory activity, cytotoxicity, and structure–activity relationship / A. Basnet, P. Thapa, R. Karki [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2007. – Vol. 15, no. 13. – P. 4351-4359.

96. Mathew, I. Photophysics of Pt (II) 4,6-diphenyl-2,2'-bipyridyl complexes in solution and in LB film / I. Mathew, W. Sun // *Journal of Organometallic Chemistry*. – 2009. – Vol. 694, no. 17. – P. 2750-2756.

97. Sangweni, N. F. The implication of low dose dimethyl sulfoxide on mitochondrial function and oxidative damage in cultured cardiac and cancer cells / N. F. Sangweni, P. V. Dlodla, N. Chellan [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, no. 23. – P. 7305.

98. Pal, R. Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells / R. Pal, N. K. K. V. Mamidi, A. K. Das [et al.] // *Archives of Toxicology*. – 2012. – Vol. 86, no. 4. – P. 651-661.

99. Verheijen, M. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro / M. Verheijen, M. Lienhard, Y. Schrooders [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, no. 1. – P. 4641.
100. Tokhtueva, M. D. The arylbipyridine platinum (II) complex increases the level of ROS and induces lipid peroxidation in glioblastoma cells / M. D. Tokhtueva, V. V. Melekhin, V. M. Abramov [et al.] // *Biometals*. – 2025. – Vol. 38. – P. 185-202.
101. Тохтуева, М. Д. Перспективы моделирования неапоптотической гибели культивируемых клеток человека с использованием комплексов платины (II) / М. Д. Тохтуева, В. В. Мелехин, В. М. Абрамов [и др.] // *Биология — наука XXI века : сборник тезисов 27-й Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием*. – Пущино : ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2024. – С. 159.
102. Hoosemans, L. Opportunities and challenges of small molecule inhibitors in glioblastoma treatment: lessons learned from clinical trials / L. Hoosemans, M. Vooijs, A. Hoeben // *Cancers*. – 2024. – Vol. 16, no. 17. – P. 3021
103. Fernandes, A. R. D. S. The influence of acute kidney disease on the clinical outcomes of patients who received cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin / A. R. D. S. Fernandes, G. A. de Brito, A. L. Baptista [et al.] // *Health Science Reports*. – 2022. – Vol. 5, no. 1. – P. e479.
104. Pompella, A. Redox mechanisms in cisplatin resistance of cancer cells: the twofold role of gamma-glutamyltransferase 1 (GGT1) / A. Pompella, A. Corti, A. Visvikis // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – Vol. 12. – P. 920316.
105. Oliveira, M. S. A novel platinum complex containing a pipartine derivative exhibits enhanced cytotoxicity, causes oxidative stress and triggers apoptotic cell death by ERK/p38 pathway in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells / M. S. Oliveira, M. I. F. Barbosa, T. B. de Souza [et al.] // *Redox Biology*. – 2019. – Vol. 20. – P. 182-194.
106. Wang, X. E platinum, a newly synthesized platinum compound, induces apoptosis through ROS-triggered ER stress in gastric carcinoma cells / X. Wang, Q. Guo, L. Tao, [et al.] // *Molecular Carcinogenesis*. – 2017. – Vol. 56, no. 1. – P. 218-231.
107. Migliore, L. Cytogenetic and oxidative damage induced in human lymphocytes by platinum, rhodium and palladium compounds / L. Migliore, G. Frenzilli, C. Nesti [et al.] // *Mutagenesis*. – 2002. – Vol. 17, no. 5. – P. 411-417.
108. Часовских, Н. Ю. Апоптоз и окислительный стресс / Н. Ю. Часовских, Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий. – Томск : Изд-во «Печатная мануфактура», 2009. – 148 с.
109. Wang, B. ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis / B. Wang, Y. Wang, J. Zhang [et al.] // *Archives of Toxicology*. – 2023. – Vol. 97, no. 6. – P. 1439-145.

110. Su, L. J. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis / L. J. Su, J. H. Zhang, H. Gomez [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2019. – Vol. 2019, no. 1. – P. 5080843.
111. Zhang, Q. Artemisinin derivatives inhibit non-small cell lung cancer cells through induction of ROS-dependent apoptosis/ferroptosis / Q. Zhang, J. Yi, J. Wang [et al.] // *Journal of Cancer*. – 2021. – Vol. 12, no. 13. – P. 4075.
112. Вострикова, С. М. Активные формы кислорода и антиоксиданты в канцерогенезе и терапии опухолей / С. М. Вострикова, А. Б. Гринев, В. Г. Гогвадзе // *Биохимия*. – 2020. – Т. 85, № 10. – С. 1474-1488.
113. Li, C. Alternol triggers immunogenic cell death via reactive oxygen species generation / C. Li, Q. Zhang, F. Li [et al.] // *Oncoimmunology*. – 2021. – Vol. 10, no. 1. – P. 1952539.
114. Ahmed, A. Targeting immunogenic cell death in cancer / A. Ahmed, S. W. G. Tait // *Molecular Oncology*. – 2020. – Vol. 14, no. 12. – P. 2994-3006.
115. Zhang, Q. Targeting immunogenic cell death for cancer immunotherapy / Q. Zhang, L. Fan, G. Kuang [et al.] // *Medicine Plus*. – 2024. – Vol. 1, no. 1. – P. 100002.
116. Xiao, R. Ferroptosis-related gene NOX4, CHAC1 and HIF1A are valid biomarkers for stomach adenocarcinoma / R. Xiao, S. Wang, J. Li [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2022. – Vol. 26, no. 4. – P. 1183-1193.
117. Yang, Z. HIF-1 α drives resistance to ferroptosis in solid tumors by promoting lactate production and activating SLC1A1 / Z. Yang, W. Su, X. Wei [et al.] // *Cell Reports*. – 2023. – Vol. 42, no. 8.
118. Sato, M. The ferroptosis inducer erastin irreversibly inhibits system xc⁻ and synergizes with cisplatin to increase cisplatin's cytotoxicity in cancer cells / M. Sato, R. Kusumi, H. Hamada [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8, no. 1. – P. 968.
119. Ngo, V. Nrf2 and oxidative stress: a general overview of mechanisms and implications in human disease / V. Ngo, M. L. Duennwald // *Antioxidants*. – 2022. – Vol. 11, no. 12. – P. 2345.
120. Тохтуева, М. Д. Комплекс платины(II) запускает в опухолевых клетках неапоптотическую гибель через генерацию АФК и активацию перекисного окисления липидов / М. Д. Тохтуева, В. В. Мелехин, А. И. Пономарев [и др.] // *Актуальные вопросы биотехнологии : сборник тезисов Международной конференции*. – 2025. – С. 199-200.
121. Lyamzaev, K. G. MitoCLOx: A Novel Mitochondria-Targeted Fluorescent Probe for Tracing Lipid Peroxidation / K. G. Lyamzaev, N. V. Sumbatyan, A. M. Nesterenko [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 9710208.

122. Maguire, J. J. Known unknowns of cardiolipin signaling: The best is yet to come / J. J. Maguire, Y. Y. Tyurina, D. Mohammadyani [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2017. – Vol. 1862, no. 1. – P. 8-24.
123. Mulkidjanian, A. Y. Does oxidation of mitochondrial cardiolipin trigger a chain of antiapoptotic reactions? / A. Y. Mulkidjanian, D. N. Shalaeva, K. G. Lyamzaev, [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2018. – Vol. 83, no. 10. – P. 1263-1278.
124. Sun, X. HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death / X. Sun, Z. Ou, M. Chen [et al.] // *Oncogene*. – 2015. – Vol. 34, no. 45. – P. 5617-5625.
125. Liu, Y. Heat shock proteins and ferroptosis / Y. Liu, L. Zhou, Y. Xu [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – Vol. 10. – P. 864635.
126. Aolymat, I. The emerging role of heat shock factor 1 (HSF1) and heat shock proteins (HSPs) in ferroptosis / I. Aolymat, M. M. Hatmal, A. N. Olaimat // *Pathophysiology*. – 2023. – Vol. 30, no. 1. – P. 63-82.
127. Zhu, S. HSPA5 regulates ferroptotic cell death in cancer cells / S. Zhu, Q. Zhang, X. Sun, [et al.] // *Cancer Research*. – 2017. – Vol. 77, no. 8. – P. 2064-2077.
128. Kung, M. L. Nanoscale characterization illustrates the cisplatin-mediated biomechanical changes of B16-F10 melanoma cells / M. L. Kung, C. W. Hsieh, M. H. Tai [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2016. – Vol. 18, no. 10. – P. 7124-7131
129. Hirata, Y. Membrane dynamics and cation handling in ferroptosis / Y. Hirata, E. Mishima // *Physiology*. – 2024. – Vol. 39, no. 2. – P. 73-87.
130. Тохтуева, М. Д. Хлор платиновый (II) комплекс 6-(4-((2-этилгексил)окси)фенил)-2,2'-бипиридина как индуктор АФК и неапоптотической гибели клеток глиобластомы / М. Д. Тохтуева, В. В. Мелехин, А. И. Пономарев [и др.] // *Вестник ДВО РАН*. – 2026. – ном. 3. – С. 84-99.
131. Jiang, Y. The mist of ferroptosis: The Orpheus journey of mitochondria-Exploring the symphony of cell fate / Y. Jiang, X. Liu, M. Sun // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2025. – Vol. 319. – P. 145472.
132. Подзолков, В. И. Ферроптоз-ассоциированное повреждение как потенциальная мишень в терапии сердечно-сосудистых заболеваний / В. И. Подзолков, А. И. Тарзиманова, Л. А. Пономарева [и др.] // *Терапевтический архив*. – 2022. – Т. 94, ном. 12. – С. 1421-1425.
133. Lu, S. C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies / S. C. Lu // *The FASEB Journal*. – 1999. – Vol. 13, no. 10. – P. 1169-1183.
134. Кордюкова, М. Ю. Повышенная активность тиоредоксинредуктазной антиоксидантной системы как фактор устойчивости стволовых клеток глиобластомы к

химиотерапии / М. Ю. Кордюкова, В. И. Мещерякова, Е. С. Пешкова [и др.] // Нейротехнологии будущего : тезисы участников конференции «Нейрокампус 2023: эволюция» (19–24 августа 2023 г.). – 2023. – Т. 1. – С. 180-183.

135. Wang, X. HIF1A/BNIP3 pathway affects ferroptosis in sepsis-induced cardiomyopathy through binding to BCL-2 / X. Wang, J. Li, Y. Zhang [et al.] // Redox Report. – 2025. – Vol. 30, no. 1. – P. 2544412.

136. Абрамов, В. М. Синтез Pt(II), Pt(IV) комплексов арилпиридинов как перспективных противоопухолевых препаратов // В. М. Абрамов, О. С. Ельцов, М. Д. Тохтуева / Сборник тезисов VIII Всероссийской (заочная) молодежной конференции – 2023 – С. 42.

137. Колесова, Е. С. Комплексы платины(II) с неапоптотическим механизмом подавления роста неопластических клеток и описание противоопухолевой активности соединений платины(IV), полученных на их основе / Е. С. Колесова, М. Д. Тохтуева, В. В. Мелехин [и др.] // Тезисы докладов 3-й Всероссийской школы-конференции, посвященной памяти профессора В. Г. Винтера. – 2024. – С. 22-24.

138. Giustarini, D. How to increase cellular glutathione / D. Giustarini, A. Milzani, I. Dalle-Donne [et al.] // Antioxidants. – 2023. – Vol. 12, no. 5. – P. 1094.

139. Germain, M. Cleavage of automodified poly (ADP-ribose) polymerase during apoptosis: evidence for involvement of caspase-7 / M. Germain, E. B. Affar, D. D'Amours [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1999. – Vol. 274, no. 40. – P. 28379-28384.

140. Mullen, P. PARP cleavage as a means of assessing apoptosis / P. Mullen // Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. – Totowa, NJ : Humana Press, 2004. – P. 171-181.

141. Ritz, C. Dose-response analysis using R / C. Ritz, F. Baty, J. C. Streibig, [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, no. 12. – P. e0146021.

142. Dolomanov, O. V. OLEX2: A Complete Structure Solution, Refinement and Analysis Program / O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea [et al.] // Journal of Applied Crystallography. – 2009. – Vol. 42. – P. 339-341.

143. Bourhis, L. J. The anatomy of a comprehensive constrained, restrained refinement program for the modern computing environment - Olex2 dissected / L. J. Bourhis, O. V. Dolomanov, R. J. Gildea, [et al.] // Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances. – 2015. – Vol. 71, no. 1. – P. 59-75.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ACSL4 – ацил-КоА синтетаза 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4)
- AIF – фактор, индуцирующий апоптоз (apoptosis inducing factor)
- APAF1 – апоптотический протеазо-активирующий фактор 1 (apoptotic protease activating factor 1)
- APS – персульфат аммония (ammonium persulfate)
- ASC – адаптерный белок с доменом активации каспаз (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD)
- ATG101 – белок 101, связанный с аутофагией (autophagy related protein 101)
- ATG12 – белок 12, связанный с аутофагией (autophagy related protein 12)
- ATG13 – белок 13, связанный с аутофагией (autophagy related protein 13)
- ATG14L – белок 14, связанный с аутофагией, подобный (autophagy related protein 14 like)
- ATG5 – белок 5, связанный с аутофагией (autophagy related protein 5)
- BAD – агонист клеточной смерти, ассоциированный с BCL-2 (BCL-2 associated agonist of cell death)
- BAK – антагонист/киллер BCL-2 (BCL-2 antagonist/killer)
- BAX – BCL-2-ассоциированный X-белок (BCL-2-associated X protein)
- BCA – бицинхониновая кислота (bicinchoninic acid)
- BCL-2 – белок 2 В-клеточной лимфомы (B-cell lymphoma 2)
- BCL-xL – большая изоформа BCL-2 (B-cell lymphoma-extra large)
- Beclin 1 – белок клеточной системы аутофагии (Beclin 1 protein)
- BH2 – дигидробиоптерин (dihydrobiopterin)
- BH3 – домен гомологии 3 белков семейства BCL-2 (BCL-2 homology domain 3)
- BH4 – тетрагидробиоптерин (tetrahydrobiopterin)
- BID – агонист смерти, взаимодействующий с BH3-доменом (BH3-interacting domain death agonist)
- BIM – BCL-2-взаимодействующий медиатор клеточной смерти (BCL-2 interacting mediator of cell death)
- BSA – бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin)
- BSO – бутиронилсульфимид (buthionine sulfoximine)
- CARD – домен активации и рекрутирования каспаз (caspase activation and recruitment domain)
- CDK – циклин-зависимые киназы (cyclin-dependent kinases)
- CIAP1/2 – клеточные ингибиторы апоптоза 1 и 2 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2)

- CoQ10 – кофермент Q10 (убихинон) (coenzyme Q10, ubiquinone)
- CoQH2 – убихинол (восстановленная форма CoQ10) (ubiquinol)
- CYLD – деубиквитиназа цилиндроматоз (deubiquitinase cylindromatosis)
- DAMPs – молекулярные паттерны, связанные с повреждением (damage-associated molecular patterns)
- DD – домен смерти (death domain)
- DIABLO – прямой IAP-связывающий белок с низкой изоэлектрической точкой (direct IAP-binding protein with low pI)
- DISC – сигнальный комплекс, индуцирующий гибель (death-inducing signaling complex)
- DMT1 – переносчик двухвалентного металла 1 (divalent metal transporter 1)
- ER – эндоплазматический ретикулум (endoplasmic reticulum)
- FADD – Fas-ассоциированный белок с доменом смерти (Fas-associated protein with death domain)
- FasL – лиганд рецептора Fas (Fas ligand)
- FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration)
- FIP200 – взаимодействующий белок семейства киназы фокальных адгезий массой 200 кДа (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa)
- FSP1 – белок-супрессор ферроптоза 1 (ранее – митохондриальный фактор 2) (ferroptosis suppressor protein 1, also known as AIFM2)
- FTH1 – тяжёлая цепь ферритина 1 (ferritin heavy chain 1)
- FTL – лёгкая цепь ферритина (ferritin light chain)
- GCH1 – GTP-циклогидролаза-1 (GTP cyclohydrolase 1)
- GPX4 – глутатионпероксидаза 4 (glutathione peroxidase 4)
- GSH – глутатион (glutathione)
- GR – глутатионредуктаза (glutathione reductase)
- GSSG – глутатиондисульфид (glutathione disulfide)
- GSK843/872 – ингибиторы RIPK3 (inhibitors of RIPK3)
- GSDMD – газдермин D (gasdermin D)
- H₂DCFDA – 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)
- HIF1A – фактор, индуцируемый гипоксией (hypoxia-inducible factor 1-alpha)
- HRP – пероксидаза хрена (horseradish peroxidase)
- IARC – Международное агентство по изучению онкологических патологий (International Agency for Research on Cancer)

- IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток (half-maximal inhibitory concentration)
- IL-18 – интерлейкин 18 (interleukin-18)
- IL-1 β – интерлейкин 1 бета (interleukin-1 beta)
- JC-1 – 5,5',6,6' тетрахло-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолил-карбоцианин йодид (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide)
- KEAP1 – белок, подобный Kelch-ECH-ассоциированному белку 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)
- LA-12 – ОС-6-43-бис(ацетато)(1-адамантиламин)амминдихлороплатина(IV) (ОС-6-43-bis(acetato)(1-adamantylamine)amminedichloroplatinum(IV))
- LOOH – липидные гидропероксиды (lipid hydroperoxides)
- LOX – липоксигеназы (lipoxygenases)
- LPS – липополисахарид (lipopolysaccharide)
- М – среднее (mean)
- MAP-LC3 – белок LC3, ассоциированный с микротрубочками (microtubule-associated protein light chain 3)
- MCL-1 – белок 1 миелоидного лейкоза (myeloid cell leukemia 1)
- MLKL – псевдокиназа, подобная киназе смешанной линии (mixed lineage kinase domain-like pseudokinase)
- MOMP – повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий (mitochondrial outer membrane permeabilization)
- MTOR – мишень рапамицина млекопитающих (mammalian target of rapamycin)
- MTT – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
- NAC – N-ацетил-L-цистеин (N-acetyl-L-cysteine)
- NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма) (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form)
- Nec-1 – некростатин-1, ингибитор RIPK1 (necrostatin-1)
- NET – нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps)
- NF- κ B – ядерный фактор каппа-би (nuclear factor kappa B)
- NLR – Nod-подобные рецепторы (Nod-like receptors)
- NLRP3 – член семейства NLR, содержащий пириновый домен 3 (NLR family pyrin domain containing 3)
- NRF2 – редокс-чувствительный транскрипционный фактор NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)

NSA – некросульфонамид, ингибитор MLKL (necrosulfonamide)

p53 – белок-супрессор опухолей (название по молекулярной массе 53 кДа) (tumor suppressor protein p53)

PAD4 – пептидил-аргинин дезаминаза 4 (protein arginine deiminase 4)

PARP1 – поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1)

PBS – натрий-фосфатный буфер (phosphate-buffered saline)

PBS-T – PBS с Tween 20 (phosphate-buffered saline with Tween 20)

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа I класса III (phosphatidylinositol 3-kinase class III)

PIP3 – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate)

POR – NADPH-зависимая цитохром P450 редуктаза (NADPH-dependent cytochrome P450 reductase)

PUMA – модулятор апоптоза, регулируемый p53 (p53 upregulated modulator of apoptosis)

RHIM – RIP-гомотипический мотив взаимодействия (RIP homotypic interaction motif)

RIPK1 – рецептор-взаимодействующая протеинкиназа 1 (receptor-interacting protein kinase 1)

RIPK3 – рецептор-взаимодействующая протеинкиназа 3 (receptor-interacting protein kinase 3)

Pt(II) – комплексы платины(II)

Pt(IV) – комплексы платины(IV)

S161 – остаток серина в положении 161 (serine residue 161)

SD – стандартное отклонение (standard deviation)

SDS – лаурилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate)

SE – стандартная ошибка (standard error)

SI – коэффициент селективности (selectivity index)

SLC11A3 – ферропортин (насос оттока железа) (ferroportin)

SLC7A11 – цистеин-глутаматный антипортер (система Xc^-) (cystine-glutamate antiporter, system Xc^-)

SMAC – второй митохондриальный активатор каспаз (second mitochondria-derived activator of caspase), также известен как DIABLO

STEAP3 – ферриредуктаза (six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3)

TEMED – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)

TFR1 – рецептор трансферрина 1 (transferrin receptor 1)

TNF – фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor)

TNF α – фактор некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha)

TNFR – рецептор фактора некроза опухолей (tumor necrosis factor receptor)

TNFR1 – рецептор фактора некроза опухоли 1 (tumor necrosis factor receptor 1)
TRADD – TNFR-ассоциированный домен смерти (TNFR-associated death domain)
TRAF2/5 – TNFR-ассоциированные факторы 2 и 5 (TNFR-associated factor 2/5)
TRAIL – TNF-связанный лиганд, индуцирующий апоптоз (TNF-related apoptosis-inducing ligand)
ULK1 – киназа, активирующая аутофагию, подобная Unc-51 (Unc-51 like autophagy activating kinase)
VPS15 – белок сортировки вакуолярных белков 15 (vacuolar protein sorting 15)
VPS34 – белок сортировки вакуолярных белков 34 (vacuolar protein sorting 34)
АТФ – аденозинтрифосфат (adenosine triphosphate, ATP)
АФК – активные формы кислорода
ВММ – внутренняя митохондриальная мембрана
ГБМ – глиобластома
ДМСО – диметилсульфоксид
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ЗНО – злокачественное новообразование
ИПС – изопропанол
КФ – культуральный флакон
ЛБ – лизис-буфер
МЛР – множественная лекарственная резистентность (multidrug resistance, MDR)
ПКГ – программируемая клеточная гибель
ПОЛ – перекисное окисление липидов
РСА – рентгеноструктурный анализ
ЦНС – центральная нервная система
ЦПМ – цитоплазматическая мембрана