

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи



Кошман Владимир Евгеньевич

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТИОСЕМИКАРБАЗОНОВ И ИХ ХЕЛАТНЫХ
КОМПЛЕКСОВ С МОДЕЛЬНЫМИ ЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ**

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

1.5.2. Биофизика

Научный руководитель:
Кандидат физико-математических наук
Селютина Ольга Юрьевна

Новосибирск – 2025

Оглавление

Список используемых сокращений.....	4
Введение.....	6
Глава 1. Литературный обзор	12
1.1. Биологическая активность тиосемикарбазонов и механизмы их противораковой активности	12
1.2. Роль окислительного стресса, ионов переходных металлов и активных форм кислорода в организме	15
1.3. Антиоксидантные и прооксидантные свойства аскорбиновой кислоты и ее применение в противораковой терапии	21
1.4. Основные модельные липидные мембраны	23
1.5. Состав и строение биологической мембраны	31
Глава 2. Объекты и методы исследования	33
2.1. Материалы и приборы	33
2.2. ¹ H ЯМР спектроскопия применительно к исследованию инициации перекисного окисления липидов	37
2.3. Спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY)	39
2.4. Метод молекулярной динамики	42
Глава 3. Взаимодействие тиосемикарбазонов с липидной мембраной	47
3.1. Взаимодействие тиосемикарбазона Dp44mT с липидной мембраной	47
3.1.1. Исследование взаимодействия Dp44mT с липидной мембраной методом ЯМР	48
3.1.2. Моделирование взаимодействия Dp44mT с липидной мембраной методом молекулярной динамики	50
3.2. Взаимодействие тиосемикарбазона DpC с липидной мембраной ..	53

3.2.1. Исследование взаимодействия DpC с липидной мембраной методом ЯМР	53
3.2.2. Моделирование взаимодействия DpC с липидной мембраной методом молекулярной динамики	54
3.3. Взаимодействие тиосемикарбазонов AODP и AOBP с липидной мембраной	55
3.3.1. Исследование взаимодействия AODP и AOBP с липидной мембраной методом ЯМР	56
3.3.2. Моделирование взаимодействия AODP и AOBP с липидной мембраной методом молекулярной динамики	58
Заключение к главе 3.	66
Глава 4. Участие хелатных комплексов тиосемикарбазонов в реакции перекисного окисления липидов	68
4.1. Редокс-активность комплекса Fe-Dp44mT в реакции перекисного окисления липидов	71
4.1.1. Реакции в мицеллах линолевой кислоты.....	72
4.1.2. Реакции в бицеллах DLPC/DHPC.....	75
4.1.3. Роль аскорбиновой кислоты в редокс-активности Fe-Dp44mT	78
4.2. Редокс-активность комплекса $[\text{Fe}(\text{DpC})_2]^+$ в реакции перекисного окисления липидов	82
4.3. Редокс-активность комплекса $[\text{Fe}(\text{AOBP})_2]^+$ в реакции перекисного окисления липидов	84
Заключение к главе 4.	86
Основные результаты и выводы.....	88
Список источников	91

Список используемых сокращений

^1H ЯМР – протонный ядерно-магнитный резонанс

АК – аскорбиновая кислота

АФК – активные формы кислорода

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

МДА – малоновый диальдегид

МД – молекулярная динамика

Метизазон – N-метилизатин тиосемикарбазон

МРТ – магнитно-резонансная томография

ОВР – окислительно-восстановительные реакции

ПАВ – поверхностно – активное вещество

Триапин / 3-AP – 3-аминопиридин-2-карбоксальдегида

ТСК – тиосемикарбазон

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ЯЭО или NOE – ядерный эффект Оверхаузера

5-HP – 5-гидроксил-2-формилпиридин тиосемикарбазон

АОВР – 2-benzoyl ((E)-N-(acridin-9-yl)-2-(phenyl(pyridin-2-yl)methylene)hydrazine-1-carbothioamide

AODP – 2-dipyridyl ((E)-N-(acridin-9-yl)-2-(di(pyridin-2-yl)methylene)hydrazine-1-carbothioamide

BE(2)-C, KELLY, SH-SY5Y, SK-N-MC – человеческие нейробластомные клеточные линии

DHPC – 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, дигексаноилфосфатидилхолин

DLPC – 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine, дилинолеоилфосфатидилхолин

DMPC – 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, димиристоилфосфатидилхолин

DOPC – 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, диолеоилфосфатидилхолин

Dp44mT – di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone

DpC – di-2-pyridylketone-4-cyclohexyl-4-methyl-3-thiosemicarbazone

FTSC – 2-формилпиридин тиосемикарбазон

GSH – глутатион

GPU – графический процессор

IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

LA – линолевая кислота

MTT – 3-(4, 5-диметилтиазолил-2)-2, 5-дифенилтетразолия бромид

NPT – статистический ансамбль с постоянным числом частиц (N), давлением (P) и температурой (T) системы

NVT – статистический ансамбль с постоянным числом частиц (N), объёмом (V) и температурой (T) системы

PME – Particle Mesh Ewald, численный метод для расчёта дальних электростатических взаимодействий в молекулярной динамике

SD – стандартное отклонение

SPC – Simple Point Charge, модель простого точечного заряда

sNOESY – selective Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (селективная ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера)

TPSA – Topological Polar Surface Area

Введение

Актуальность работы

Образование свободных радикалов непрерывно происходит в организме. Как правило, этот процесс сбалансирован работой антиоксидантной системы. Однако, при увеличении концентрации свободных радикалов, в частности, активных форм кислорода, возникает окислительный стресс, приводящий к повреждению важных биологических структур, таких как белки, липиды, ДНК [1, 2, 3].

Свободные радикалы инициируют старение и различного рода воспалительные процессы организма. Важную роль в этих явлениях играет процесс перекисного окисления липидов, который возникает вследствие окислительного стресса в результате нарушения баланса между прооксидантами и антиоксидантами в клетке [4]. Контролируемый окислительный стресс рассматривается как перспективный подход в противораковой терапии [5].

Особое внимание в контексте управления окислительным стрессом уделяется хелаторам – соединениям, связывающим ионы металлов. Хелатные комплексы широко применяются в медицине для терапии заболеваний, ассоциированных с дисбалансом железа [6]. Помимо этого, ряд хелатирующих агентов используется в онкологии в качестве противораковых средств. Эффективность данного терапевтического подхода может зависеть от специфических условий, например, от наличия переходных металлов, таких как железо, которое в опухолевых клетках присутствует в повышенных концентрациях и способствует генерации свободных радикалов [7]. Железо играет ключевую роль в реакции Фентона, в результате которой генерируется гидроксильный радикал. Препараты на основе соединений-хелаторов избирательно связывают железо в опухолевых клетках, усиливая генерацию активных форм кислорода и запуская ферроптоз – железозависимую форму клеточной смерти [8, 9, 10, 11, 12]. Свободные радикалы могут образовываться в организме в том числе через механизмы, не требующие участия металлов. Например, через ферментативные реакции, фотоактивацию, радиолиз воды или

использование синтетических соединений. Наряду с соединениями–хелаторами могут применяться лекарственные препараты, генерирующие свободные радикалы без участия железа [13, 14]. Таким образом, использование окислительного стресса может быть одним из путей для избирательной противоопухолевой терапии [15].

Ряд хелатных соединений может быть использован в качестве противораковых агентов. В роли таких хелаторов в рамках данной работы выступают тиосемикарбазоны di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT), 2-benzoyl ((E)-N-(acridin-9-yl)-2-(phenyl(pyridin-2-yl)methylene)hydrazine-1-carbothioamide (АОБР) и 2-dipyridyl ((E)-N-(acridin-9-yl)-2-(di(pyridin-2-yl)methylene)hydrazine-1-carbothioamide (AODP). Тиосемикарбазоны (ТСК) обладают широким спектром биологической активности и вызывают повышенный интерес ученых различных областей науки. Их противораковую активность долгое время связывали со способностью ингибировать рибонуклеотид редуктазу [6, 16, 17]. Однако недавние исследования указывают на значительную роль окислительного стресса в противоопухолевой активности ТСК [17, 18]. Этот аспект их биологической активности в настоящее время очень мало изучен и представляет большой интерес для медицинской химии. Известно, что данный класс соединений играет важную роль в процессах генерации свободных радикалов [19, 20, 21, 22, 23]. Металлсодержащие комплексы тиосемикарбазонов, проникая через клеточную мембрану, способны инициировать апоптоз клетки. Одним из механизмов активности ТСК считается их способность проникать через лизосомальную мембрану, и образовывать редокс-активные комплексы с ионами металлов внутри лизосом. Предполагается, что данные комплексы способны вызывать перекисное окисление липидов лизосомальной мембраны опухолевой клетки с её последующей гибелью [24, 25]. В данной связи необходимо исследовать взаимодействие этих соединений с липидной мембраной на предмет их способности проникать внутрь липидной мембраны и инициировать реакции перекисного окисления липидов.

Другим важным агентом в контексте окислительно-восстановительных процессов является аскорбиновая кислота. Благодаря своим донорно-акцепторным свойствам она может проявлять как антиоксидантную, так и прооксидантную активность. Это двойственное поведение позволяет использовать её в каталитической противораковой терапии, где комбинация субстрата и катализатора (например, ионов металлов) вызывает избирательное образование АФК, разрушающих опухолевые клетки [26, 27]. Таким образом, управление окислительным стрессом с помощью хелаторов и антиоксидантов открывает новые возможности для разработки таргетных терапевтических стратегий, основанных на уязвимости раковых клеток к дисбалансу редокс-систем. Исследования в этой области продолжают углублять понимание молекулярных механизмов, что важно, как для создания новых лекарств, так и для оптимизации существующих подходов в лечении онкологических заболеваний.

Цель работы

Охарактеризовать особенности взаимодействия di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT), di-2-pyridylketone-4-cyclohexyl-4-methyl-3-thiosemicarbazone (DpC), а также N-акридиновых тиосемикарбазонов 2-benzoyl ((E)-N-(acridin-9-yl)-2-(phenyl(pyridin-2-yl)methylene)hydrazine-1-carbothioamide (АОБР) и 2-dipyridyl ((E)-N-(acridin-9-yl)-2-(di(pyridin-2-yl)methylene)hydrazine-1-carbothioamide (AODP) и их Fe-содержащих комплексов с модельной липидной мембраной.

Задачи работы

1. Установить локализацию тиосемикарбазонов Dp44mT, DpC, АОБР и AODP в модельной липидной мембране
2. Определить влияние холестерина на локализацию тиосемикарбазонов Dp44mT, DpC, АОБР и AODP в модельной липидной мембране
3. Исследовать окислительно-восстановительную активность Fe-содержащих комплексов тиосемикарбазонов в реакции перекисного

окисления в модельных липидных системах в присутствии и отсутствии аскорбиновой кислоты.

4. Проанализировать роль аскорбиновой кислоты в окислительно-восстановительной активности комплексов.

Научная новизна

В работе впервые был применен экспериментально-расчетный подход, включающий в себя метод спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера и моделирование методом молекулярной динамики, для определения локализации малых лекарственных молекул на примере тиосемикарбазонов Dp44mT, DpC, AOBP, AODP в модельной липидной мембране, состоящей из DMPC/DHPC фосфолипидов, и выполнено сравнение локализации для исследуемых соединений. Впервые проведена сравнительная характеристика локализации молекул, относящихся к разным группам тиосемикарбазонов в модельном липидном бислое в зависимости от наличия холестерина в нем. Также впервые была исследована окислительно-восстановительная активность железосодержащих комплексов исследуемых тиосемикарбазонов в реакции перекисного окисления липидов на примере липида DLPC и линолевой кислоты и охарактеризована роль аскорбиновой кислоты в их редокс активности.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные о физико-химических аспектах взаимодействия тиосемикарбазонов с липидной мембраной проясняют механизм противораковой активности данных соединений. Полученные результаты могут быть использованы как для разработки новых препаратов данного класса, так и для оптимизации стратегий противоопухолевой терапии с использованием данных соединений. Не менее важным аспектом данного исследования является предложенный экспериментально-расчетный подход, перспективный для исследования потенциальных лекарственных соединений.

Методология и методы исследования

В работе использовался ряд физико-химических методов, включающий в себя ^1H ЯМР спектроскопию, спектроскопию ядерного эффекта Оверхаузера

(NOESY), оптическую спектрофотометрию в УФ и видимом диапазоне, а также моделирование методом молекулярной динамики.

Положения, выносимые на защиту

1. Пространственная локализация тиосемикарбазонов (Dp44mT, DpC, AOBP, AODP) в модельной липидной мембране обусловлена их особенностями структуры.
2. Наличие холестерина в концентрации 20 мол.% по отношению к концентрации фосфолипидов приводит к вытеснению исследованных тиосемикарбазонов из гидрофобной области липидного бислоя на его поверхность.
3. Редокс-активность комплексов железа с тиосемикарбазонами в реакции перекисного окисления липидов существенно различается: от высокой прооксидантной активности $[\text{Fe}(\text{DpC})_2]^+$ и активности $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$, зависимой от присутствия аскорбиновой кислоты, до полной инертности комплекса $[\text{Fe}(\text{AOBP})_2]^+$.

Апробация работы

Работа поддержана стипендией президента РФ.

Основные результаты были представлены в виде устных и постерных докладов на 8 всероссийских и международных конференциях: Modern development of magnetic resonance (Казань, 2025), Юбилейная X Междисциплинарная конференция «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» МОБИ-ХимФарма2025 (Санкт-Петербург, 2025), Magnetic resonance and its Applications. Spinus-2024 (Санкт-Петербург, 2024), VII съезд биофизиков России (Краснодар, 2023), International Voevodsky conference physics and chemistry of elementary chemical processes (Новосибирск, 2022), Modern development of magnetic resonance (Казань, 2022), XXXIII Симпозиум "Современная химическая физика" (Туапсе, 2021), Диплом 3 степени 59th International Scientific Student Conf (Новосибирск, 2021).

Публикации материалов диссертации. По результатам исследований опубликовано 12 работ, включая 4 статьи, входящих в международные цитатно-

аналитические базы Scopus и Web of Science, ВАК, Белый список, а также 8 тезисов в материалах конференций.

Личный вклад соискателя

Подготовка образцов для экспериментов, проведение экспериментов, проведение молекулярно-динамических расчетов, обработка данных были осуществлено автором лично.

Постановка задачи, обсуждение результатов, полученных в ходе работы, были произведены совместно с научным руководителем, к.ф.-м.н. Селютиной О. Ю., и с руководителем лаборатории Магнитных явлений ИХКГ СО РАН, д. х. н. Поляковым Н. Э. Квантово-химические расчеты геометрии и распределения зарядов для тиосемикарбазнов АОВР и АОДР были проведены Дмитриевым А. А. из лаборатории КХКМ ИХКГ СО РАН.

Достоверность полученных результатов

Подтверждена применением современных методов исследования, достаточным объемом данных, воспроизводимостью результатов и их согласием с литературными данными.

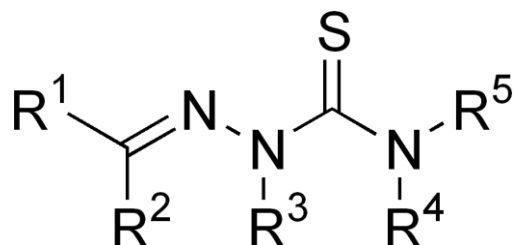
Объем и структура работы

Диссертационная работа написана на 103 страницах машинопечатного текста, содержит 44 рисунка, 4 таблицы. Состоит из списка используемых сокращений, введения, четырех глав, содержащих литературный обзор, описание объектов и методов исследования, результаты и выводы. Список литературы содержит 154 наименования.

Соответствие специальности 1.5.2. Биофизика (физико-математические науки)

Диссертационная работа соответствует пунктам 2 «Молекулярная биофизика. Структура и динамика макромолекул», 4 «Биофизика мембранных процессов. Биофизика процессов транспорта веществ (включая макромолекулы) через биомембраны», 5 «Образование радикалов, активные формы кислорода и азота» паспорта специальности 1.5.2. Биофизика (физико-математические науки).

Тиосемикарбазоны – сераорганические соединения, общая структурная формула которых приведена на Рисунке 1.



Большое количество этих соединений было исследовано на предмет антимикробного, противовирусного и противоопухолевого действия. В частности, тиосемикарбазоны были клинически разработаны для лечения туберкулеза, вирусных инфекций, малярии и онкологических заболеваний. Первым клинически одобренным препаратом этого класса соединений (представленным в конце 1940-х годов) был пейцетамидобензальдегид тиосемикарбазон (тиоацетазон), который до сих пор используется для лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью. Вторым клинически исследованным тиосемикарбазоном (поступившим в продажу в 1960-х годах) был N-метилизатин тиосемикарбазон (метизазон) - агент, разработанный против оспы, который из-за развития вакцинации против оспы больше не применяется. Клинические противораковые исследования в основном сосредоточены на α -N-гетероциклических тиосемикарбазонах. Поскольку эти соединения являются мощными хелаторами для ионов металлов, включая железо, они изначально были разработаны с целью удовлетворить повышенную потребность раковых клеток в железе. Уже в 1956 году сообщалось, что первое производное, 2-формилпиридин тиосемикарбазон (FTSC), проявило активность против лейкемии у мышей. После обширных исследований структуры и

активности наиболее многообещающее соединение, 5-гидроксил-2-формилпиридин тиосемикарбазон (5-HP), было протестировано в клинической фазе I испытаний и было показано, что оно обладает противораковой активностью у пациентов с лейкемией. К сожалению, эти тесты также выявили серьезные побочные эффекты (в основном желудочно-кишечную токсичность) и быструю инактивацию глюкуронидацией. Дальнейшая оптимизация привела к разработке тиосемикарбазона 3-аминопиридин-2-карбоксальдегида (триапин, 3-AP) - соединения, которое было протестировано в более чем 30 клинических испытаниях. Триапин показал многообещающую активность против гематологических заболеваний [28].

Отчасти широкий спектр биологической активности ряда тиосемикарбазонов и их металл-содержащих комплексов обусловлен их способностью проникать через клеточную мембрану с последующей инициацией апоптоза [29, 30, 31, 32]. Например, описана противоопухолевая активность в отношении клеток лейкемии [33, 34], клеточной линии рака толстой кишки человека, и ряда других онкологических заболеваний [35]. Недавно было показано, что тиосемикарбазоны в комбинации с препаратом тамоксифен имеют высокий потенциал в качестве альтернативной терапии при лечении рака молочной железы [36]. Способность тиосемикарбазонов хелатировать ионы металлов в настоящее время признана решающим фактором их антипролиферативного действия. Окислительно-восстановительная активность комплексов тиосемикарбазонов с железом приводит к окислительному повреждению важных биологических структур. Так, хелатирование переходных металлов, в частности внутриклеточного железа, приводит к ингибированию железосодержащих белков [37]. Связывание тиосемикарбазонов с ионами металлов играет большую роль также и в связи с тем, что опухолевые клетки имеют более высокий уровень рибонуклеотидредуктазы, чем нормальные клетки, и поэтому более чувствительны к хелатированию железа [17]. Кроме того, было установлено, что, попадая в лизосому, тиосемикарбазон Dp44mT участвует в окислительно-восстановительном цикле с ионами меди, генерируя

активные формы кислорода (АФК), вызывающие перекисное окисление лизосомальной мембраны с последующим апоптозом [24]. Роль тиосемикарбазонов в окислительном стрессе подтверждается различными экспериментами *in vitro*. Так, показано, что в присутствии тиосемикарбазонов происходит увеличение выхода гидроксильного радикала в реакции Фентона [38]. Ряд тиосемикарбазонов демонстрируют также существенное увеличение выхода активных форм кислорода в экспериментах на клеточных культурах НСТ116 (рак толстой кишки), сопровождающееся клеточной гибелью [39]. Тиосемикарбазоны широко исследуются также в качестве агентов, усиливающих действие фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии [40, 41].

Благодаря липофильным свойствам, ТСК могут выступать в роли ионофоров, способных переносить ионы металлов через клеточную мембрану. Хелаторы меди с ионофорной активностью известны своей многообещающей эффективностью и селективностью в отношении раковых клеток [39, 42]. В целом, липофильность препарата имеет решающее значение для противораковой активности. Хелаторы с высокой липофильностью могут иметь преимущества перед более гидрофильными лигандами, поскольку они легко проникают в клетки и впоследствии истощают железо и медь из внутриклеточных пулов. Кроме того, эти молекулы могут взаимодействовать с железосодержащим центром рибонуклеотидредуктазы [43]. Было продемонстрировано увеличение антипролиферативной активности с ростом гидрофобности хелатора [43, 44, 45].

Поскольку гидрофобные молекулы могут проникать через липидную мембрану путем пассивной диффузии, сродство лекарства к гидрофобной внутренней части мембраны может быть важным для их активности [46]. Однако в настоящее время имеется мало данных о взаимодействии тиосемикарбазонов с липидной мембраной. Описано взаимодействие с липидной мембраной некоторых тиосемикарбазонов [47, 48]. Так, было показано, что 2-нитробензальдегид-тиосемикарбазон (2-ТСК) вызывает структурные изменения в мембране 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DMPC), встраиваясь в нее, сильно снижая кооперативность фазового перехода гель-жидкость в

бислое [47]. Тиосемикарбазон 2-benzoylpyridine 4-ethyl-3-thiosemicarbazone (Br4eT) способен быстро проникать в клетки через метаболический энергонезависимый механизм, соответствующий пассивной диффузии [47]. Липидный состав играет важную роль в антипролиферативной активности препаратов, направленных на лизосомы. Так, накопление холестерина снижает апоптоз за счет повышения стабильности лизосомальной мембраны [49]. Содержание холестерина также влияет на антипролиферативную активность Dr44mT [50]. Также отмечается, что повышенная антибактериальная и противогрибковая активность комплексов по сравнению со свободным лигандом может быть обусловлена повышенной липофильностью комплексов [51].

Таким образом, способность тиосемикарбазонов проникать в липидный бислой, а также хелатирование ионов переходных металлов (железа и меди) и участие в окислительно-восстановительных реакциях, и в частности в реакциях перекисного окисления липидов клеточных мембран, играет важную роль в противораковой активности тиосемикарбазонов.

1.2. Роль окислительного стресса, ионов переходных металлов и активных форм кислорода в организме

Окисление является естественным процессом, протекающим в человеческом организме. По оценкам, каждая клетка подвергается примерно $1,5 \cdot 10^5$ окислительным ударам в день [52]. В норме существует баланс между генерацией свободных радикалов и работой антиоксидантных систем организма. Если генерация радикалов существенно усиливается, то клетки испытывают состояние, известное как окислительный стресс. Окислительный стресс возникает в клетке вследствие дисбаланса антиоксидантов и свободных радикалов. Свободные радикалы - частицы, содержащие один или несколько неспаренных электронов на внешней электронной оболочке, что обуславливает высокую реакционную способность данных соединений. Несмотря на то, что явное превалирование прооксидантов приводит к повреждению важных биомолекул и клеток с потенциальным воздействием на весь организм, без них

он не может нормально функционировать, поскольку свободные радикалы играют важную роль в процессах метаболизма клетки, участвуя в реакциях окислительного фосфорилирования, биосинтеза нуклеиновых кислот, в регуляции липидного обмена, в процессах митоза. Например, лейкоциты используют свободные радикалы для борьбы с инфекциями. Кислородсодержащие радикалы являются продуктами нормального клеточного метаболизма и играют жизненно важную роль в стимуляции сигнальных путей в клетках растений и животных в ответ на изменения внутри и внеклеточных условий окружающей среды [53].

При избыточном содержании, свободные радикалы являются факторами деградации клеточных структур, в конечном результате, способствующими их гибели. Мишенями для окислительной атаки являются белки, липиды, молекулы ДНК [52]. Модификация этих молекул может увеличить риск мутагенеза. Таким образом, жизненно важно поддерживать баланс антиоксидантов и прооксидантов в организме. Чтобы контролировать баланс между производством и удалением свободных радикалов существует множество ферментов репарации ДНК, хотя антиоксиданты более специфичны и эффективны в защите клеток от свободных радикалов. Эта антиоксидантная система включает как эндогенные, так и экзогенные, а также ферментативные и неферментативные антиоксиданты. Например, глутатион (GSH) - это трипептид и основной эндогенный антиоксидант, продуцируемый клетками, который помогает защитить клетки от активных форм кислорода (АФК) [54]. В настоящее время хорошо известно, что кислородсодержащие радикалы и электрофильные химические вещества могут повреждать ДНК, и что GSH может защищать от этого типа повреждений. GSH может также непосредственно выводить токсины из канцерогенов через метаболизм и последующий экспорт этих химических веществ из клетки [55]. Аскорбиновая кислота, известная как витамин С, также является одним из основных антиоксидантов в организме человека, играющим ключевую роль в защите организма от окислительного стресса. Её функции разнообразны и включают нейтрализацию свободных радикалов, активацию

внутриклеточных антиоксидантных систем и взаимодействие с другими молекулами [56, 57].

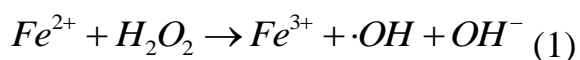
Активные формы кислорода – кислородсодержащие реактивные молекулы, включающие свободные радикалы и нерадикальные соединения. Активные формы кислорода продуцируются в эукариотических клетках посредством аэробного метаболизма, обладают высокой реакционной способностью [58]. Они включают гидроксильные ($\text{HO}\bullet$) и супероксидные (O_2^-) свободные радикалы и нерадикальные молекулы, такие как перекись водорода (H_2O_2), которая менее активна, чем большинство АФК. АФК производятся в клетках дыхательной цепью митохондрий, в пероксисомах, в эндоплазматической сети. Также АФК непрерывно генерируются в ферментативных реакциях с участием циклооксигеназ, НАДФН-оксидаз, ксантиноксидаз и липоксигеназ, а также посредством реакции Фентона, катализируемой железом. Наконец, АФК образуются после воздействия физических агентов (ультрафиолетовые лучи и тепло), а также в процессе химиотерапии и лучевой терапии опухолей. Перенос электронов на молекулярный кислород происходит на уровне дыхательной цепи, а цепи переноса электронов расположены в мембранах митохондрий. В условиях гипоксии дыхательная цепь митохондрий также производит оксид азота (NO), который может генерировать другие активные формы азота [52].

Окислительный стресс играет важную роль в канцерогенезе, поскольку может вызвать апоптоз раковых клеток [59]. АФК также способны вызывать некроз, который первоначально считался нерегулируемой формой клеточной смерти, но в настоящее время признан отдельным типом запрограммированной клеточной гибели. Кроме того, недавно был выявлен молекулярный механизм подавления опухоли с помощью белка p53, связанный с АФК. Этот белок вызывает особую форму гибели клеток, называемую ферроптозом, через повышение уровней АФК. Ферроптоз зависит от наличия внутриклеточного железа и индуцируется АФК, и его характерной особенностью является железо-зависимое перекисное окисление липидов. Данное явление достаточно широко

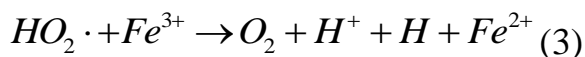
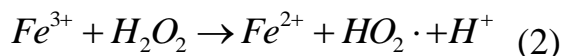
изучается в последние годы, в том числе в контексте его применения в противораковой терапии [60]. Окисление липидов приводит к глубоким изменениям химической структуры жирнокислотных цепочек. Продукты окисления липидов становятся более полярными по сравнению с исходными ненасыщенными жирными кислотами в связи с тем, что в процессе окисления в структуре липидов в гидрофобных хвостах жирнокислотных цепей появляются гидрофильные химические группы [61]. В связи с этим, широко исследуются аспекты влияния окисления липидов клеточных мембран на такие их свойства как текучесть, упорядоченность, латеральная организация, проницаемость [61]. Изменения этих свойств могут влиять как на жизнеспособность клеток, так и на функции связанных с мембраной белков [62]. В настоящее время ведутся исследования возможных способов стимулирования перекисного окисления липидов в клетках опухоли как перспективного способа терапии рака [63].

Повышение АФК в опухолевых клетках обусловлено повышенной скоростью метаболизма. С одной стороны, умеренное увеличение АФК способствует развитию опухоли посредством участия в различных сигнальных путях и вызывания мутации ДНК. С другой стороны, АФК также способны вызывать запрограммированную гибель клеток. Зачастую используемые радио- и химиотерапевтические препараты влияют на развитие опухоли через изменение концентраций АФК [52]. Одним из важных источников АФК является реакция Фентона [7]. В ходе данной реакции Fe(II) или Fe(III) реагирует с H_2O_2 с образованием активных форм кислорода в виде гидроксильного радикала ($\cdot OH$), супероксидного радикала ($O_2^{\cdot -}$). Предполагается, что тип образующихся реакционных частиц зависит в основном от pH среды и состава координационной сферы железа [64, 65].

Инициация перекисного окисления липидов происходит с участием свободных радикалов, например ($\cdot OH$), источником которых может являться реакция Фентона (1).

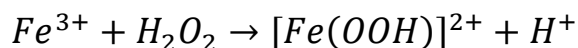
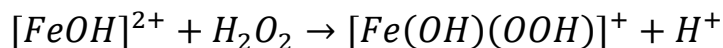


Fe(III) реагирует с H_2O_2 , образуя пергидроксильный радикал ($HO_2 \cdot$). $HO_2 \cdot$ имеет более низкую окислительную активность, чем другие АФК, но участвует в восстановлении Fe(III) до Fe(II) (3), что приводит к циклизации реакции (1) [37].

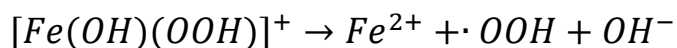
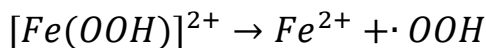


Константа скорости реакции (1) ($k = 76 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) на четыре порядка выше, чем константа скорости реакции (2) ($k = 0,01 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [66].

Скорость реакции Фентона сильно зависит от pH среды [66]. Существуют разные подходы к объяснению этого эффекта. Например, показано, что константа скорости реакции для $[Fe(OH)]^+$ на пять порядков выше, чем для Fe^{2+} . При этом при pH=3 концентрация $[Fe(OH)]^+$ в $3 \cdot 10^6$ ниже, чем концентрация Fe^{2+} , а при pH=4 в $3 \cdot 10^5$. Таким образом, хотя наиболее реакционно-способной формой является $[Fe(OH)]^+$, его концентрация слишком мала, чтобы это было главной движущей силой реакции. Поэтому, хотя обе формы вовлечены в реакцию Фентона, основной, особенно при низких pH, является Fe^{2+} . Концентрация $[Fe(OH)]^+$ увеличивается при pH=4 и достигает максимума при pH=10. Оптимальным значением pH для реакции Фентона является pH=3. Это объясняется с позиции особенностей строения комплексов Fe(III). При высоких pH происходит образование пероксокомплекса $[Fe(OH)]^{2+}$, который принимает участие в реакции Фентона.



Максимальная концентрация $[Fe(OH)]^{2+}$ и $[Fe(OOH)]^{2+}$ достигается при pH=3 (оптимальное значение для реакции Фентона). Лимитирующей стадией реакции Фентона является разложение $[Fe(OOH)]^{2+}$ или $[Fe(OH)(OOH)]^+$:



Данные реакции являются источниками Fe^{2+} и $\text{HO}_2\bullet$, который восстанавливает Fe(III) до Fe(II) [66].

Окислительно-восстановительные свойства металлов и лигандов в комплексах переходных металлов предлагают необычные пути активации изначально неактивных форм пролекарств на основе металлокомплексов в активные противоопухолевые агенты за счет окислительно-восстановительных реакций, происходящих в условиях опухолевой среды с низким содержанием кислорода. Восстанавливающее микроокружение опухоли дает возможность пролекарствам на основе металлокомплексов избирательно активироваться под действием редокс-процессов раковыми клетками в гипоксической среде. Таким образом, существует большой потенциал для разработки биовосстанавливаемых пролекарств на основе комплексов металлов. Комплексы металлов имеют множество структурных и электронных особенностей, которые могут быть использованы при разработке лекарств. Можно варьировать сам металл и его степень окисления, а также координационную геометрию и координационные числа. Эти свойства позволяют точно настроить химическую реакционную активность, включая скорость обмена лигандом, прочность связей металл-лиганд, окислительно-восстановительные потенциалы, конформации лигандов и взаимодействия внешней координационной сферы. Помимо металла, лиганды также могут играть важную роль в биологической активности. Они могут участвовать в распознавании мишеней и при высвобождении участвовать в биохимических реакциях. Механизм окислительно-восстановительной активации обеспечивает высокоэффективную стратегию лечения рака, особенно потому, что он обеспечивает селективность по сравнению с нормальными клетками. Комплексы металлов могут вмешиваться в окислительно-восстановительную химию клетки несколькими способами: напрямую, через окислительно-восстановительные центры металлов или лигандов, или косвенно, путем связывания с биомолекулами, участвующими в окислительно-восстановительных процессах в клетке. Таким образом, окислительно-восстановительные свойства металлов и лигандов в комплексах переходных

металлов открывают необычные пути для новых механизмов противоопухолевой терапии, поскольку комплексы металлов могут вызывать искусственный восстановительный и окислительный стресс в раковых клетках, включая поведение в качестве фотоактивируемых агентов и катализаторов. То есть, относительно инертные комплексы металлов («пролекарства») могут активироваться окислительно-восстановительными процессами в раковых клетках [67, 68, 69].

1.3. Антиоксидантные и прооксидантные свойства аскорбиновой кислоты и ее применение в противораковой терапии

Аскорбиновая кислота (Рисунок 2, АК, витамин С) – водорастворимый антиоксидант, регулирующий окислительно-восстановительные реакции (ОВР) в организме, предупреждающий разные заболевания радикального характера и принимающий участие в важных процессах внутри клетки. Помимо антиоксидантной, витамин С имеет хелатирующую и коферментную активность и принимает участие в защите липидов в перекисном окислении в экспериментах *in vivo* [70].

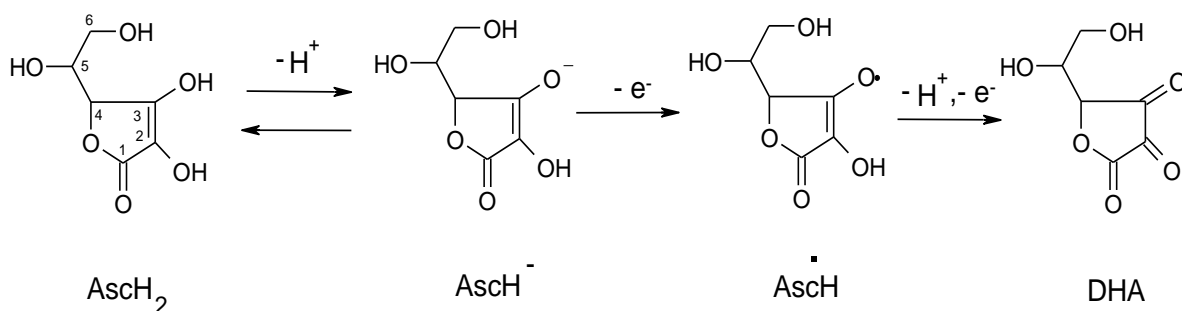


Рисунок 2. Структуры аскорбиновой кислоты и её основных продуктов окислительно-восстановительных реакций [71].

Как антиоксидант, АК обеспечивает эффективную защиту мембран и белков от окисления активными формами кислорода, такими как супероксид (O₂•⁻), пероксид водорода (H₂O₂), гидроксильный радикал (•OH), пероксильный радикал (•OOH) и синглетный кислород ¹O₂ [71].

Также аскорбиновая кислота восстанавливает другие антиоксиданты, например, жирорастворимые витамины А и Е в организме. Однако данный витамин может также быть источником свободных радикалов, поскольку реагирует с ионами переходных металлов, в частности, железом и медью, восстанавливая их. Применение АК во время лучевой терапии влечет увеличение устойчивости опухолевых клеток к облучению. Таким образом, АК может проявлять как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства [72]. Наиболее характерно проявление прооксидантных свойств при избыточном содержании АК и особенно ее метаболитов, таких как дегидроаскорбат и монодегидроаскорбат [73].

Доставка аскорбиновой кислоты в клетки реализуется благодаря специфическим натрий-зависимым аскорбат-транспортерам SVCT1 и SVCT2. Экспрессия гена SVCT1 происходит в эпителии тонкого кишечника, почках и печени. SVCT2 экспрессируется в костях, тканях, нейронах и эндокринных железах. Также витамин С повышает всасывание железа из кишечника [74].

В настоящее время используется ряд лечебных стратегий для увеличения выживаемости онкологических больных, включая химиотерапию, лучевую терапию, фотодинамическую терапию и каталитическую терапию. Аскорбиновая кислота играет важную роль в каталитической терапии рака, которая основана на генерации АФК, таких как гидроксильный радикал, с использованием комбинации комплексов переходных металлов в качестве катализатора и второй молекулы в качестве субстрата. Чаще всего, в качестве катализатора выступают комплексы переходных металлов с порфиринами, а в качестве субстрата – аскорбиновая кислота. Как описано выше, АК проявляет прооксидантную активность в присутствии переходных металлов, таких как медь и железо. Идея каталитической терапии заключается в прооксидантном действии АК в присутствии ионов металлов. Механизм цитотоксического действия аскорбата против раковых клеток включает в себя окислительно-восстановительный цикл экзогенных/эндогенных ионов металлов и последующее образование АФК, приводящее к окислительному разрушению

ДНК. Медь является важным компонентом хроматина и может принимать участие в окислительно-восстановительных реакциях. Хорошо известно, что уровни меди в тканях, клетках и сыворотке крови значительно повышены при различных злокачественных новообразованиях. Следовательно, раковые клетки могут быть более подвержены переносу электронов между ионами меди и аскорбатом для генерации АФК. Аскорбат считается наиболее подходящим субстратом для данной терапии, поскольку многие опухоли накапливают аскорбат в большей степени, чем нормальные клетки, из-за высокой скорости метаболизма. Таким образом обеспечивается селективное уничтожение раковых клеток при относительно низких концентрациях аскорбата [27].

1.4. Основные модельные липидные мембраны

Липидные мембраны играют ключевую роль в функционировании клеток, обеспечивая барьерные свойства, компартментализацию и участие в сигнальных процессах. Для изучения их структурно-динамических характеристик и взаимодействия с биомолекулами (например, белками, лекарственными соединениями) разработаны модельные системы, воспроизводящие свойства природных мембран. Под модельными мембранами будем подразумевать упрощенные системы, которые имитируют свойства биологических мембран клеток и служат инструментом для изучения сложных процессов, происходящих в них. В данной главе рассмотрены основные типы модельных липидных мембран, их преимущества, ограничения и области применения.

1.4.1. Мицеллы

Мицеллы – это наноразмерные агрегаты поверхностно-активных веществ (липидов, детергентов), которые самопроизвольно образуются в растворе при достижении критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Состоят из набора амфифильных молекул и представляют собой структуры, в которых гидрофобные хвосты молекул обращены внутрь, а гидрофильные головы – наружу, в водный раствор (Рисунок 3). Они широко используются в биофизике

и биохимии как упрощенные модели для изучения мембранных процессов, несмотря на структурные отличия от классических бислойных мембран.

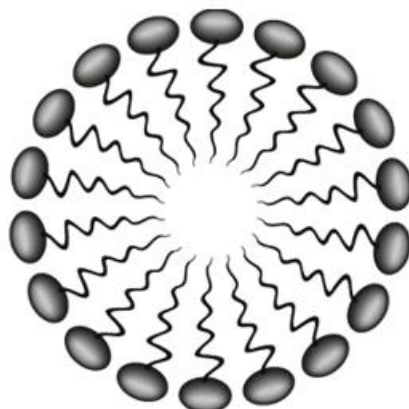


Рисунок 3. Схематическое изображение мицеллы.

Образование мицелл ионными поверхностно-активными веществами (ПАВ) обусловлено балансом между гидрофобным притяжением углеводородных цепей и электростатическим отталкиванием ионных головок. Гидрофобное притяжение углеводородных цепей обусловлено силой, которая заставляет неполярные (гидрофобные) хвосты молекул ПАВ объединяться друг с другом в воде. Поскольку вода - полярный растворитель, она избегает контакта с неполярными углеводородными цепями, и эти цепи стремятся минимизировать площадь контакта с водой. В ионных ПАВ гидрофильные головки несут заряд (положительный или отрицательный). Эти заряды создают электростатические силы отталкивания между соседними молекулами, поскольку одноимённые заряды отталкиваются друг от друга. Это ограничивает плотность упаковки молекул в мицелле и влияет на её размер и форму. При этом суммарный (чистый) заряд мицелл оказывается меньше степени агрегации, что свидетельствует о значительной связи противоионов с мицеллой, формирующих слой Штерна на её поверхности. Эти противоионы прочно связываются с поверхностью мицеллы, нейтрализуя часть ее заряда. Для неионных поверхностно-активных веществ мицеллообразование определяется равновесием между гидрофильными группами, требующими гидратации (вокруг них образуется слой воды, который занимает пространство и препятствует слишком плотной упаковке) и пространства, и гидрофобными взаимодействиями на коротких расстояниях.

Таким образом, химическая структура ПАВ напрямую влияет на размер и форму образующихся мицелл [75].

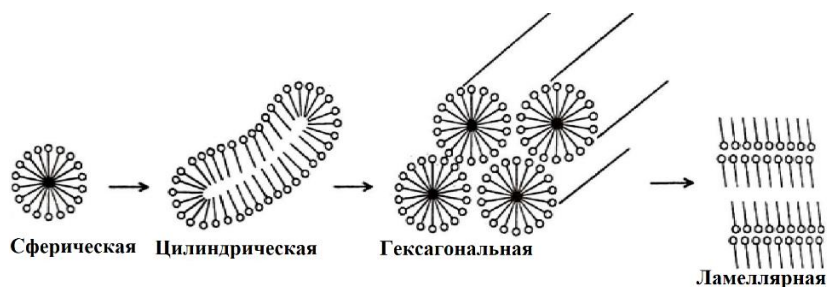


Рисунок 4. Изменения формы и структуры мицелл при изменении концентрации поверхностно-активного вещества. Адаптировано из [75].

Форма и структура мицелл были выяснены с помощью таких методов, как ЯМР, ЭПР, нейтронное рассеяние и т. д. Было показано, что по мере увеличения концентрации ПАВ форма ионных мицелл изменяется в последовательности: сферическая → цилиндрическая → гексагональная → ламеллярная (Рисунок 4). Для неионных мицелл с увеличением концентрации ПАВ форма мицелл изменяется непосредственно от сферической к ламеллярной [75].

Мицеллы имитируют свойства биологических мембран благодаря своей структуре и поведению в растворе, что позволяет эффективно изучать взаимодействие малых молекул с мембраной в условиях, близких к естественным [76]. Размеры мицелл варьируются в нанометровом диапазоне 5 – 100 нм, что позволяет применять метод ЯМР спектроскопии в целях исследования их структуры в растворах без кристаллизации [77]. Небольшой размер и изотропное быстрое вращение мицелл также делают их удобными для ЯМР-спектроскопии высокого разрешения в связи с уменьшением ширины линии ЯМР сигнала [76]. Благодаря возможности варьировать химическую структуру ПАВ, можно изучать мицеллы разнообразной морфологии (сферические, цилиндрические, ламеллярные и другие типы мицелл) [77]. Благодаря мягкой и динамичной структуре мицелл облегчена динамика захвата

и высвобождения малых молекул, что хорошо отслеживается по изменениям ЯМР-сигналов [77].

В данной работе были использованы мицеллы линолевой кислоты в качестве модельной системы, имитирующей свойства биологической мембраны. Данные мицеллы представляют собой сферические агрегаты, где гидрофобные углеводородные цепи ненасыщенной жирной кислоты ориентированы внутрь, а карбоксильные группы ($-\text{COOH}$) образуют гидрофильную оболочку, контактирующую с водной средой. Такие мицеллы формируются при концентрациях выше критической мицеллярной концентрации, равной ~ 60 мкМ, при физиологическом pH $\sim 7.4\text{--}7.5$ [78, 79]. Мицеллы линолевой кислоты применяются для изучения перекисного окисления липидов (ПОЛ). Линолевая кислота содержит бис-аллильные группы, которые легко окисляются под действием свободных радикалов, что делает её удобной моделью для исследования окислительных процессов в мембранах. В том числе данная модельная система находит применение для задач моделирования взаимодействия с антиоксидантами/прооксидантами, так как позволяет изучать механизмы перекисного окисления в присутствии переходных металлов и редокс активных соединений. Наряду с такими преимуществами, как простота приготовления, высокая чувствительность к окислителям, данная модельная система в том числе обладает рядом ограничений, а именно, мицеллы линолевой кислоты не воспроизводят структуру бислоя биологических мембран, динамическая природа мицелл может затруднять интерпретацию данных.

1.4.2. Бицеллы

Другая модельная система, имитирующая клеточную мембрану - бицеллы. Представляют собой плоский липидный бислой, состоящий из длинноцепочечных фосфолипидов, окруженный барьером из детергентов – короткоцепочечных фосфолипидов (Рисунок 5).

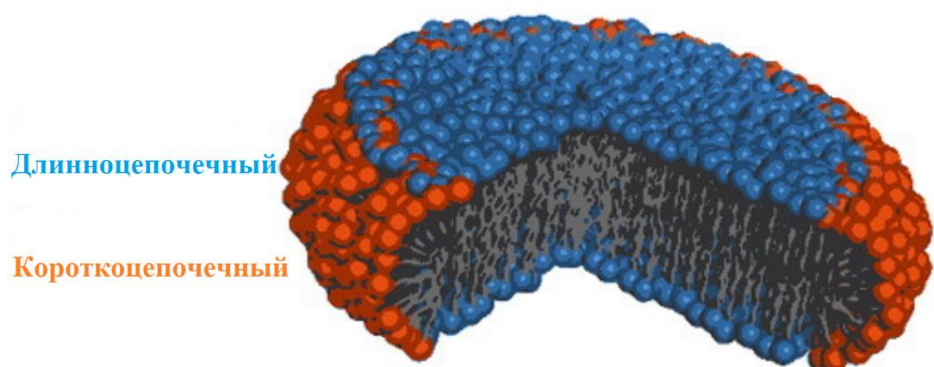


Рисунок 5. Схематическое изображение бицеллы, состоящей из длинноцепочечных/короткоцепочечных фосфолипидов.

Классической моделью являются 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC)/ 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DHPC) бицеллы, где DMPC - длинноцепочечный липид, а DHPC - короткоцепочечный детергент. Однако для имитации различных биологических условий и свойств бицелл могут использоваться и другие липиды, например, DLPC (1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). Наличие бис-аллильного атома Н между двумя двойными связями в полииненасыщенном жирнокислотном остатке DLPC фосфолипида делает удобным исследование инициации перекисного окисления DLPC/DHPC бицелл.

Размер бицелл определяется соотношением длинноцепочечных и короткоцепочечных липидов $q = [\text{длинноцепочечный}] / [\text{короткоцепочечный}]$. При соотношении $q = [\text{DMPC}] / [\text{DHPC}] = 0.5$ и концентрациях 15 - 300 mM бицеллы имеют распределение размеров (радиус порядка 10 - 20 нм), соответствующее классической дискообразной морфологии [80]. Чем меньше суммарная концентрация DMPC/DHPC липидов, тем больше концентрация свободного короткоцепочечного DHPC липида, который находится в быстром обмене между мицеллами и ансамблем свободных молекул DHPC (часть DHPC образует мицеллы, часть находится в составе бицелл, а часть - в свободном состоянии) [80].

Бицеллы находят широкое применение в спектроскопических исследованиях (ЯМР, ЭПР) [81]. Их изотропная природа позволяет получать

высококачественные спектры для анализа взаимодействия молекул с мембраной. Также данная модельная система находит свое применение для изучения встраивания белков и малых молекул, поскольку моделирует участки бислоя с контролируемым липидным составом [82, 83, 84]. Изменяя соотношение длинноцепочечных и короткоцепочечных липидов, можно регулировать размер и стабильность бицелл, адаптируя их под конкретные задачи. Наряду с вышеперечисленными преимуществами бицеллы обладают рядом недостатков. Они являются чувствительными к условиям среды. Стабильность бицелл зависит от температуры, pH и ионной силы, что накладывает определенные ограничения на их использование в физиологических условиях. Размерные ограничения сужают спектр возможных экспериментов. Поскольку диаметр бицелл обычно не превышает 50 нм, является затруднительным изучение крупных белковых комплексов или процессов, требующих макромасштабной организации мембран. При некорректном подборе соотношения длинноцепочечных и короткоцепочечных липидов или липидного состава возможно образование мицелл или везикул вместо бицелл, что снижает воспроизводимость [85].

1.4.3. Липосомы

Липосомы представляют собой искусственные замкнутые везикулы, состоящие из одного или нескольких concentрических липидных бислоев, окружающих водный компартмент, диаметром $\sim 0.05 - 5$ мкм (Рисунок 6). Способны самообразовываться при помещении липидов в воду [86].

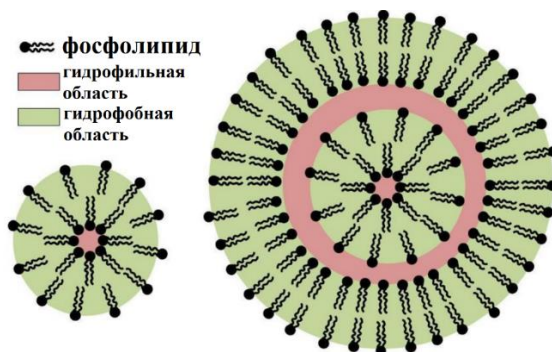


Рисунок 6. Схематическое изображение однослойных (слева) и многослойных (справа) липосом.

Данная модельная система широко применяется в биофизике, медицине и биотехнологии как наиболее близкий аналог естественных клеточных мембран. Их структура позволяет изучать мембранные процессы в контролируемых условиях и разрабатывать прикладные решения для доставки веществ, в том числе лекарственных соединений [87]. Липосомы демонстрируют уникальную способность инкапсулировать как гидрофильные молекулы - в водном ядре, так и гидрофобные соединения - в липидном бислое. Липосомы, содержащие парамагнитные ионы, например, комплексы марганца [88], гадолиния [89], могут использоваться в качестве контрастных агентов для МРТ диагностики. Для увеличения эффективности МР контрастирования важно, чтобы вода быстро обменивалась между внутренним объемом липосомы, где находится парамагнитный ион, и внешней средой. Если сделать мембрану более проницаемой для воды, с одной стороны, это решит проблему с доступом воды к парамагнитному иону, с другой стороны, приведет к дестабилизации липосом, поскольку они становятся менее устойчивыми в биологических жидкостях: могут преждевременно разрушаться, слипаться (агрегировать), либо терять инкапсулированный агент до достижения цели [90]. Липосомы могут быть быстро захвачены клетками ретикулоэндотелиальной системы (печень, селезёнка) и долго в них задерживаются, что может приводить к накоплению и потенциальной токсичности при длительном применении или высоких дозах (отмечены повреждения костного мозга, печени и селезёнки при длительном введении) [90].

Несмотря на то, что липосомы являются менее динамичными в отличие от мицелл и лучше подходят для долгосрочных экспериментов, они обладают физической нестабильностью, а именно, склонны к агрегации, слиянию или разрушению при хранении, что является определенным ограничением применимости этой модельной системы. Кроме того, по причине большого размера, данные системы плохо подходят для проведения ЯМР-экспериментов в жидкости из-за значительного уширения сигналов от липидов в спектре.

1.4.4. Липидные нанодиски

Липидными нанодисками называются наноразмерные дискоидальные липидные бислои диаметром 8–16 нм, которые стабилизируются и становятся растворимыми в водных растворах двумя окружающими амфипатическими спиральными белковыми поясами, называемыми мембранными каркасными белками [91, 92] (Рисунок 7). Размер нанодисков определяется длиной мембранного каркасного белка и стехиометрией липидов, используемых в процессе самосборки [93].

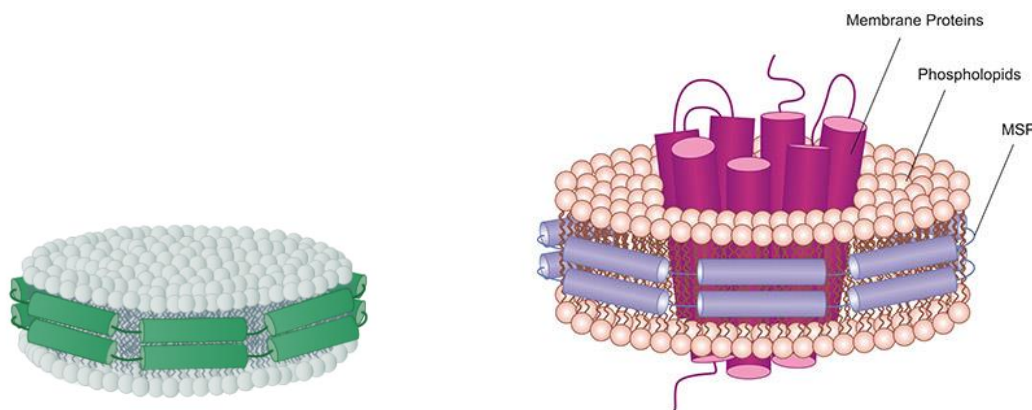


Рисунок 7. Схематическое изображение липидного нанодиска, состоящего из липидного бислоя, стабилизированного амфифильными молекулами (слева) и усложненной модели липидного нанодиска для исследования интегральных мембранных белков и их взаимодействия с липидами (справа).

Эта система была разработана для преодоления ограничений классических моделей мембран (липосом, мицелл) и стала привлекательным инструментом в изучении мембранных белков и липид-белковых взаимодействий [94, 95, 96].

Данная модельная система имеет ряд достоинств: сохранение нативной конформации мембранных белков (в отличие от мицелл, липидные нанодиски обеспечивают плоский бислой без кривизны, критичной для структуры трансмембранных доменов), возможность включения специфических липидов для имитации мембран разных типов клеток, в отличие от липосом липидные нанодиски не склонны к агрегации и сохраняют целостность в широком диапазоне pH и ионной силы, подходят для исследования интегральных и

периферических мембранных белков, липид-белковых комплексов, а также механизмов взаимодействия вирусов с мембранами [94, 95, 96, 97]. Наряду с вышеперечисленными достоинствами данная модельная система обладает недостатками. Ограниченный размер (диаметр липидного нанодиска ≤ 20 нм) затрудняет изучение крупных белковых комплексов [98]. Существуют также сложности подготовки гетерогенных систем поскольку воспроизведение асимметричных мембран или липидных рафтов требует многоэтапной оптимизации. Липидные нанодиски представляют собой «золотую середину» между упрощенными мицеллами и сложными клеточными мембранами. Их ключевое преимущество — способность сохранять нативную структуру мембранных белков, что делает их незаменимыми в структурной биологии и биофизике. Однако ограничения, связанные с размером и сложностью сборки, требуют дальнейшей оптимизации.

1.5. Состав и строение биологической мембраны

Биологические мембраны представляют собой динамические асимметричные системы, организованные по принципу жидкостно-мозаичной модели (Сингер-Николсон, 1972). Их основу составляет липидный бислой, в котором гидрофобные хвосты жирных кислот направлены внутрь, а полярные головы — наружу, при этом формируя гидрофильные поверхности. Эта структура обеспечивает барьерные свойства, но сохраняет гибкость за счет латеральной диффузии липидов и белков. Толщина биологических мембран составляет несколько молекулярных слоев и редко превышает 10 нм. Мембраны ограничивают цитоплазму и большинство внутриклеточных структур, а также образуют единую внутриклеточную систему канальцев, складок и замкнутых полостей. В состав биологических мембран входят белки, липиды, углеводы. Белки и липиды вносят основной вклад сухой массы биомембран. В различных биологических мембранах липидное содержание колеблется в диапазоне 25 – 75% по массе по отношению к белку. Мембранные липиды состоят из сравнительно маленькой полярной головы и длинных неполярных

углеводородных цепей. Жирные кислоты, входящие в состав липидов, обычно содержат 14 – 22 углеродных атомов [99]. Белки, составляющие биологические мембраны, отличаются большим разнообразием. Их распределение в мембране является неоднородным. В зависимости от степени гидрофобности и расположения гидрофобных аминокислотных остатков в полипептидной цепи, интегральные белки могут частично или полностью погружаться в липидный слой мембраны, а некоторые из них пронизывают мембрану насквозь. В отличие от интегральных белков, которые глубоко встроены в липидный слой, периферические белки связаны с мембраной более слабо и взаимодействуют преимущественно с поверхностными липидами. Состав липидов в клеточных мембранах может варьироваться. Однако ключевым компонентом большинства клеточных мембран являются фосфатидилхолины, на которые приходится ~18 – 50% липидной массы. Еще одним важным элементом выступает холестерин, составляющий ~5 – 20% от общего количества липидов [99, 100]. Данные пропорции отражают функциональные и структурные особенности мембран в разных типах клеток.

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1. Материалы и приборы

В работе использовалась линолевая кислота (Shanghai Aladdin Bio-Chem Technology Co., Ltd., Shanghai, China, чистота >99.0%, Рисунок 8) для приготовления мицелл. Для этого линолевая кислота предварительно растворялась в хлороформе. Затем растворитель высушивался, и полученная липидная пленка растворялась в 0.5 мл фосфатно-солевого буфера в D₂O (99,9% D, Cambridge Isotope Laboratories) (pH=7.4). Итоговая концентрация линолевой кислоты в образце составляла 3.5 mM.

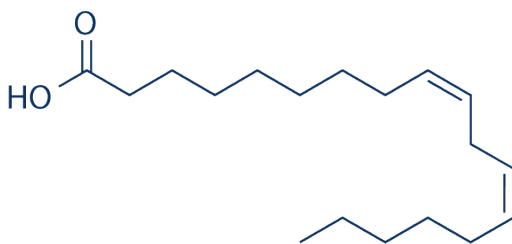


Рисунок 8. Структура линолевой кислоты.

Для исследования перекисного окисления липидов в бицеллах использовались фосфолипиды DHPC (1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) и DLPC (1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (Avanti Polar Lipids, Inc., Birmingham, AL, чистота >99%, Рисунок 9, 10). Для исследования локализации тиосемикарбазонов в липидной мембране вместо DLPC использовался DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (Рисунок 11). Соотношение концентраций DHPC:DLPC и DHPC:DMPC составляло 2:1, что соответствует малым изотропным липидным бицеллам [80]. Порошковые компоненты (липиды, тиосемикарбазоны, хелатные комплексы тиосемикарбазонов) предварительно растворялись в хлороформе / смеси хлороформа и этанола, затем растворитель высушивался, и полученная липидная пленка растворялась в 0.5 мл фосфатно-солевого буфера в D₂O (pH=7.4) как и в

случае приготовления мицелл линолевой кислоты. Итоговая суммарная концентрация липидов в образце составляла 12 мМ. После этого образцы подвергались трехкратному циклу заморозки-разморозки с последующим перемешиванием. Для исследования влияния холестерина на локализацию тиосемикарбазонов в бицеллах 2.4 мМ (20 мольных % от суммарной концентрации фосфолипидов в образце) данного соединения добавлялось на этапе добавления порошковых компонентов фосфолипидов (MP Biomedicals, LLC, Рисунок 12).

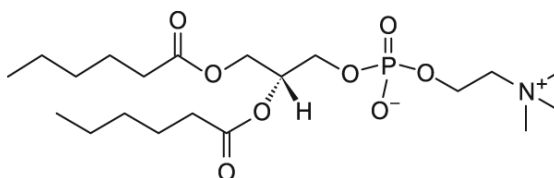


Рисунок 9. Структурная формула фосфолипида DHPG.

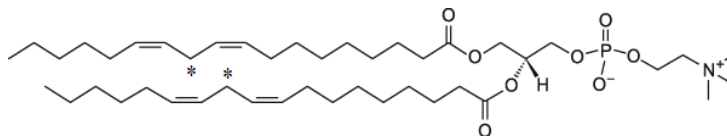


Рисунок 10. Структурная формула фосфолипида DLPG.

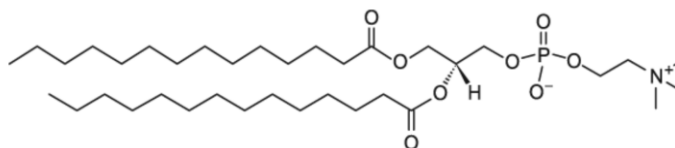


Рисунок 11. Структурная формула фосфолипида DMPC.

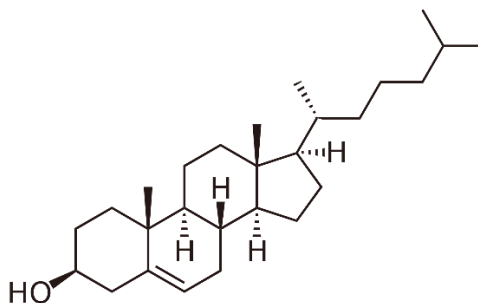


Рисунок 12. Структурная формула холестерина.

Реакция перекисного окисления липидов инициировалась добавлением 0.5 М H_2O_2 . В экспериментах по исследованию влияния аскорбиновой кислоты на

процесс окисления липидов, 2.5 мМ аскорбиновой кислоты добавлялось к реакционной смеси в воде. Лиганды и выделенные комплексы лиганд-металл (Рисунок 13, 14, 15, 16) были предоставлены профессором Ридчардсоном (Griffith Institute for Drug Discovery).

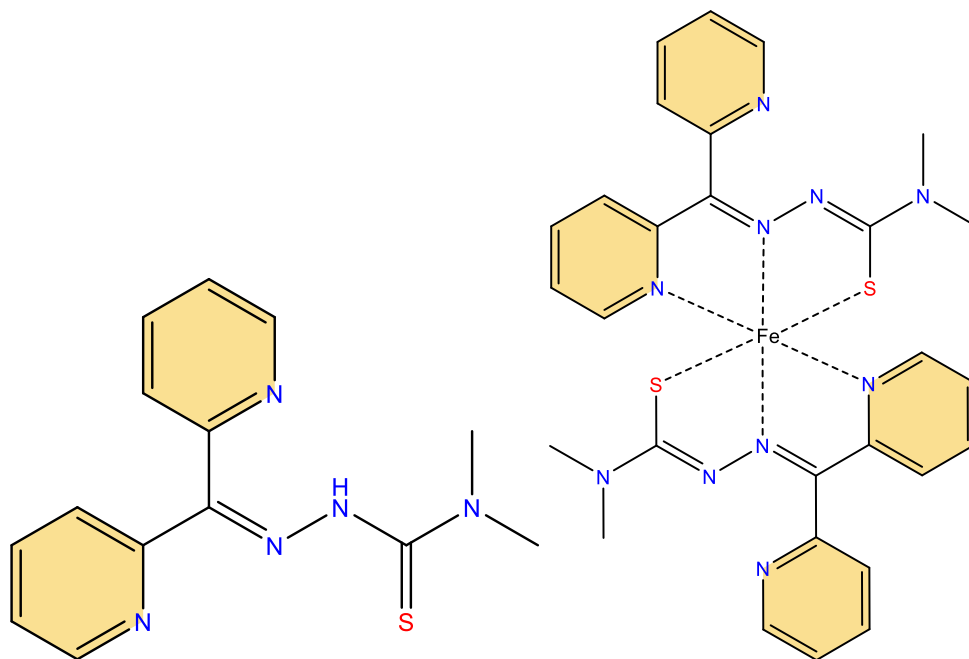


Рисунок 13. Структурные формулы di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone Dp44mT (слева) и его хелатный комплекс (справа).

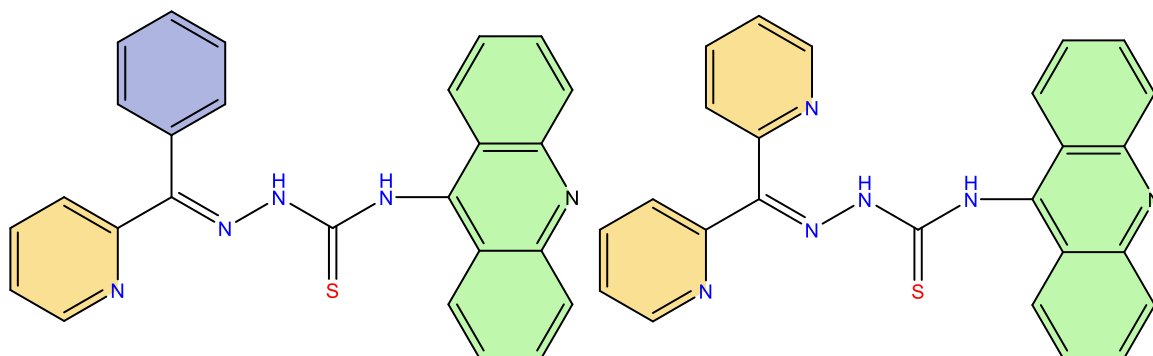


Рисунок 14. Структурные формулы 2-benzoyl ((E)-N-(acridin-9-yl)-2-(phenyl(pyridin-2-yl)methylene)hydrazine-1-carbothioamide (AOBP, слева) и 2-dipyridyl ((E)-N-(acridin-9-yl)-2-(di(pyridin-2-yl)methylene)hydrazine-1-carbothioamide (AODP, справа).

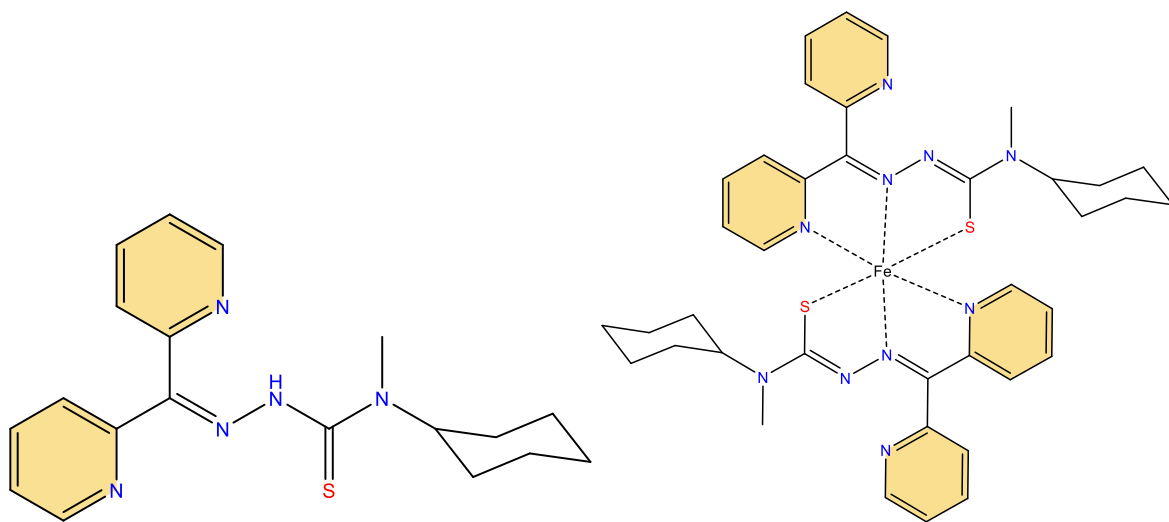


Рисунок 15. Структурные формулы di-2-pyridylketone-4-cyclohexyl-4-methyl-3-thiosemicarbazone DpC (слева) и его хелатный комплекс (справа).

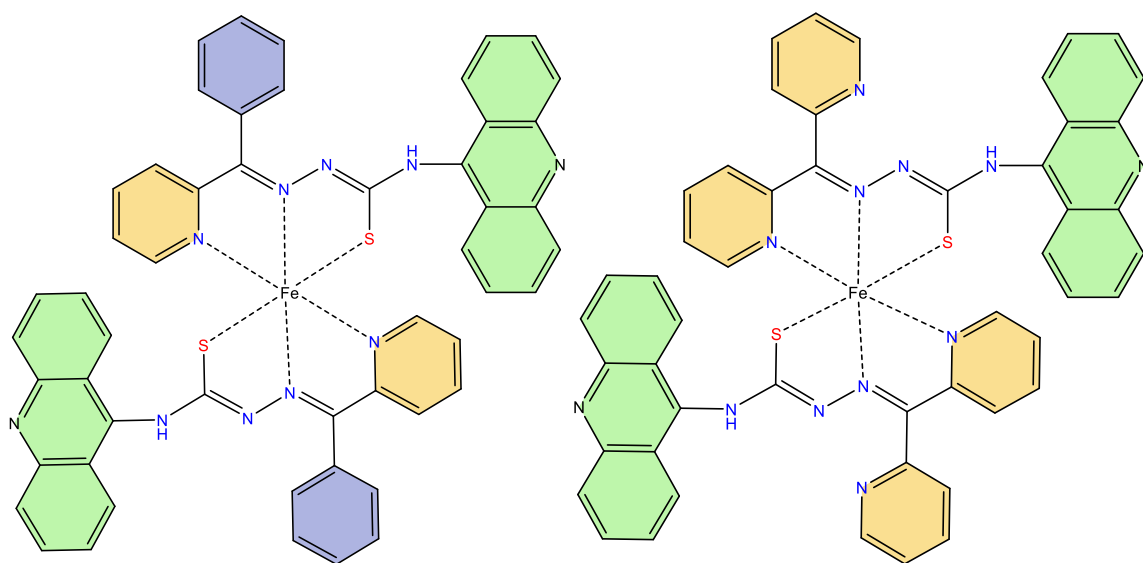


Рисунок 16. Структурные формулы хелатных комплексов [Fe(AOBP)₂]⁺ (слева) и [Fe(AODP)₂]⁺ (справа).

Все ЯМР-эксперименты проводились на спектрометре Bruker AVHD-500 (500 МГц) при температуре 303K. Оптические спектры поглощения были получены с помощью спектрофотометра СФ-2000 (Спектр, Россия).

Экспериментальная часть данной работы была выполнена с помощью следующих методов:

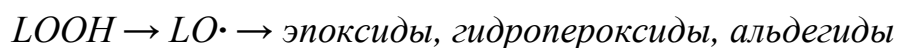
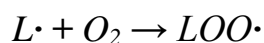
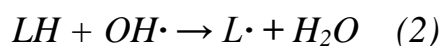
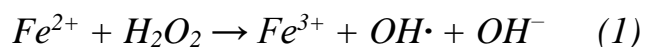
- ¹H ЯМР спектроскопия
- спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY)

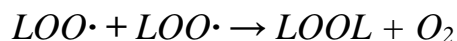
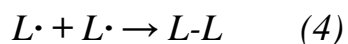
- моделирование методом молекулярной динамики
- оптическая спектрофотометрия

2.2. ^1H ЯМР спектроскопия применительно к исследованию инициации перекисного окисления липидов

Для исследования реакций инициации перекисного окисления липидов (ПОЛ) применялся метод ^1H ЯМР спектроскопии. Данный метод позволяет следить за изменением интегральной интенсивности сигналов различных функциональных групп протонов во времени, что является ключевым моментом анализа скорости реакции инициации ПОЛ. Так, в процессе эксперимента наблюдается уменьшение интегральной интенсивности сигналов, соответствующих протонам при двойных связях в ненасыщенных жирных кислотах, а также появление новых сигналов, соответствующих окисленным продуктам. Сравнение спектров на различных этапах реакции помогает установить скорость окисления и оценить степень окисления липидов.

Эксперименты по исследованию скорости реакции перекисного окисления липидов проводились с использованием методов спектрометрии ядерного магнитного резонанса, на спектрометре Bruker Avance III (500 МГц). Реакция перекисного окисления липидов состоит из следующих стадий: (1) генерация активных форм кислорода в реакции Фентона; (2) инициация реакции с полиненасыщенными липидами (отрыв бис-аллильного атома Н между двумя двойными связями в полииненасыщенном жирнокислотном остатке (Рисунок 10) и линолевой кислоте (Рисунок 8)); (3) продолжение цепи, с образованием продуктов (гидропероксиды, альдегиды, эпоксиды); (4) обрыв цепи (образование полимера):

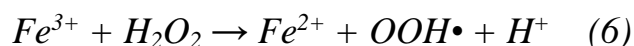




Влияние аскорбиновой кислоты проявляется в восстановлении Fe^{3+} до Fe^{2+} описано реакцией (5):



Лимитирующей стадией окисления липида является переход $Fe(III)$ в $Fe(II)$ согласно реакции (6):



Перекисное окисление линолевой кислоты широко изучается в различных модельных системах, в том числе липосомах [101]. Но в большинстве случаев скорость перекисного окисления липидов оценивается по кинетике образования продуктов перекисного окисления липидов [102, 103, 104, 105]. Некоторые методы используются для оценки скорости инициации перекисного окисления липидов, но в большинстве случаев они также связаны с обнаружением продуктов, например, конъюгированных гидропероксидов липидов [106]. Так, например, анализировать продукты перекисного окисления липидов можно методом оптической спектроскопии, благодаря реакции малонового диальдегида (МДА), побочного продукта реакции, с 2-тиобарбитуровой кислотой. В ходе этой реакции возникает продукт с максимумом поглощения на длине волны 535 нм [107]. Несмотря на то что метод оптической спектроскопии поглощения обладает высокой чувствительностью, что является безусловным преимуществом, данный подход не всегда отражает реальный уровень окислительного повреждения, поскольку МДА является одним из множества побочных продуктов и скорость его накопления не отражает скорости разложения исходного липида. Также исследования перекисного окисления липидов проводят с помощью хемилюминесцентного анализа, регистрируя свечение при взаимодействии Fe^{2+} с H_2O_2 и с липидами [108, 109]. Идея подхода заключается в том, что в процессе окисления липидов образуются активированные промежуточные продукты, способные вызывать хемилюминесценцию, которая регистрируется

хемилюминометром. Данный метод также обладает высокой чувствительностью, но требует тщательной пробоподготовки в целях исключения влияния посторонних веществ.

В рамках данной работы было охарактеризовано влияние ряда хелаторов (Dp44mT, AOBP, AODP) на начальную стадию перекисного окисления липидов - отрыв атома водорода из бис-аллильного положения с образованием сопряженных диенов и липидных радикалов, а также определено влияние аскорбиновой кислоты на эти реакции.

2.3. Спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY)

Спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY) позволяет наблюдать пространственную близость между группами протонов, что может быть полезно для определения взаиморасположения ядер в исследуемой системе. NOESY - это метод ЯМР, в котором передача намагниченности между спинами происходит за счет магнитной дипольной связи (сквозного пространственного взаимодействия). Интенсивность сигнала ядерного эффекта Оверхаузера (NOE или ЯЭО) обратно пропорциональна межъядерному расстоянию как ($\sim 1/r^6$). Резкое падение интенсивности NOE как $1/r^6$ свидетельствует о том, что эффект можно наблюдать только при малых расстояниях между ядрами (в пределах ~ 5 Å). В результате этот метод обладает большими возможностями для определения пространственной структуры молекул, а также их локализации внутри липидной мембраны.

Физические основы метода ядерной спектроскопии, основанного на эффекте Оверхаузера, включают в себя взаимодействие между ядрами в молекуле посредством диполь-дипольного взаимодействия. Это взаимодействие влияет на релаксацию ядер и изменяет интенсивность их сигналов в ЯМР-спектре.

Релаксация ядер происходит через каналы W_0 , W_1 и W_2 , которые описывают различные механизмы передачи энергии между ядрами (Рисунок 17). Для небольших молекул в невязких растворах преобладает канал W_2 , что

приводит к возникновению положительного NOE. Для медленного движения молекул превалирующим вкладом является W_0 канал, что приводит к возникновению отрицательного NOE эффекта.

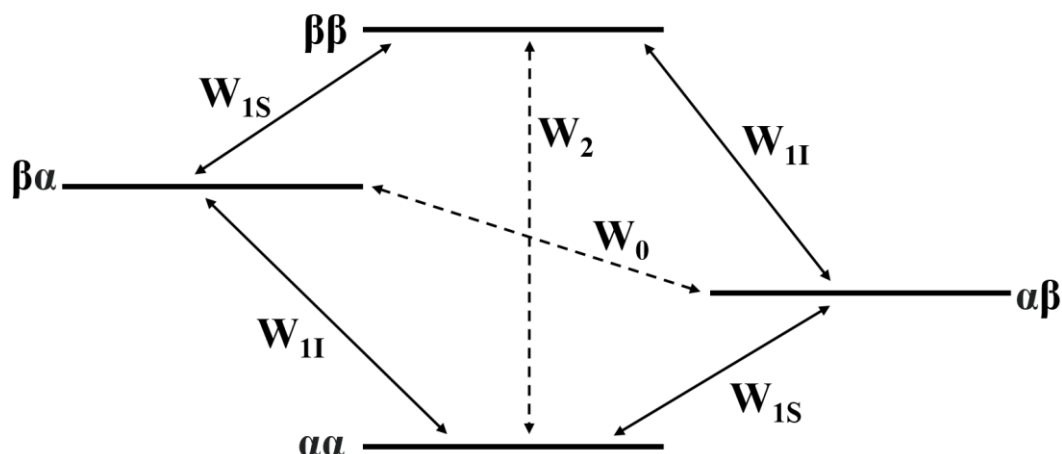


Рисунок 17. Схематическая диаграмма энергетических уровней и разности населенностей для двух диполь-дипольно связанных спинов S и I.

Знак и величина ЯЭО зависят от времени корреляции молекулы и типа ядер. Для небольших молекул ЯЭО обычно положителен, а для больших молекул или вязких растворов он может быть отрицательным. Для описания взаимосвязи между интенсивностью сигналов ЯМР и эффектом кросс-релаксации между ядрами, находящимися в близком пространственном расположении применяется уравнение Соломона:

$$\eta_I\{S\} = \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \left[\frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2 \cdot W_1^I + W_2} \right] \equiv \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \left[\frac{\sigma_{IS}}{\rho_{IS}} \right], \quad \text{где } \gamma - \text{гироманнитное отношение}$$

соответствующего ядра, W_0 , W_1 и W_2 - каналы передачи энергии между ядрами, σ_{IS} - скорость кросс-релаксации спинов I и S, ρ_{IS} - константа скорости дипольный продольной релаксации. Заметим, что числитель $W_2 - W_0$ определяет знак эффекта NOE. Таким образом, уравнение Соломона в методе NOE является ключевым для анализа пространственных взаимодействий в молекулах, предоставляя информацию о расстояниях и конфигурациях ядер в сложных биомолекулах.

В данной работе использовалась импульсная последовательность одномерного селективного NOESY (sNOESY) selnogr. Данная импульсная

последовательность представляет собой модификацию стандартного NOESY эксперимента, в которой используются селективные импульсы для избирательного возбуждения определённых ядер. Это позволяет изучать взаимодействия между конкретными группами атомов в сложных системах (например, в мембранах) без помех от других компонентов. Импульсная последовательность *selnogr* приведена на Рисунке 18, где G_1 , G_2 , $-G_2$ градиенты вдоль оси z , d_1 – релаксационная задержка, d_8 – время смешивания, p_{12} – длительность селективного 180° РЧ импульса.

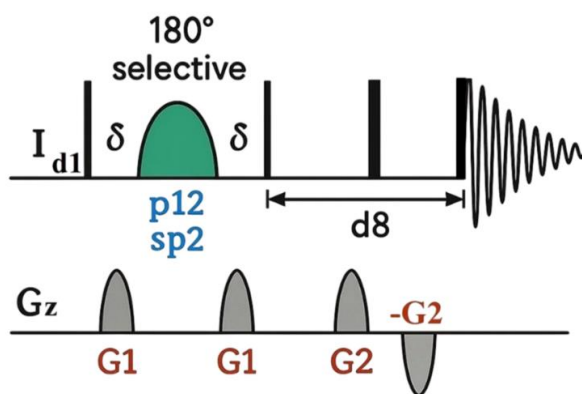


Рисунок 18. Импульсная последовательность *selnogr* селективного NOESY эксперимента.

В ^1H ЯМР экспериментах с ядерным эффектом Оверхаузера пики NOE детектировались методом 1D селективной градиентной спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера [110]. Время смешивания было оптимизировано с помощью кривой нарастания NOE, путем варьирования значения времени смешивания от 0.1 до 1 с для получения сигналов с максимальной интенсивностью. Оптимальное значение времени смешивания в селективном градиентном эксперименте NOESY составляло 0.6 с. Все эксперименты проводились при фиксированной температуре 303 К. Полученные спектры ЯМР были обработаны с помощью программного пакета TopSpin.

В получаемых ЯМР спектрах NOESY по наличию кросс-пиков и их интегральной интенсивности можно оценить вероятность контакта протонов

тиосемикарбазона с разными фрагментами молекулы липида путем вычисления скорости кросс-релаксации. Скорости кросс-релаксации были рассчитаны следующим образом [111, 112]:

$$\sigma_{IS} = \frac{A_{IS}(t_m)}{t_m A_{II}(t_m)}, \text{ где } A_{II} - \text{интегральная интенсивность 1D NOESY сигнала}$$

насыщаемого сигнала, A_{IS} – интегральная интенсивность наблюдаемого 1D NOESY сигнала кросс-пики, t_m – время смешивания.

2.4. Метод молекулярной динамики

Метод классической молекулярной динамики (МД) представляет собой мощный инструмент для моделирования и анализа поведения атомарных систем. Он используется для изучения динамики молекул, их взаимодействий и структурных изменений в различных условиях.

В основе метода лежит классическая ньютоновская механика. Движение атомов молекул системы в общем виде описывается вторым законом Ньютона:

$F_i = m_i \cdot a_i$, где F_i – сила, действующая на i –ый атом в молекуле, m_i – масса данного атома, а a_i – его ускорение.

Алгоритмами программного пакета для моделирования происходит расчет временной эволюции ансамбля атомов посредством последовательного интегрирования классических уравнений движения:

$$\begin{aligned} m_i \cdot \frac{d\vec{v}_i}{dt} &= -\frac{\partial U(\vec{r})}{\partial \vec{r}_i} = \vec{F}_i \\ \frac{d\vec{r}_i}{dt} &= \vec{v}_i \end{aligned},$$

где \vec{v}_i , \vec{r}_i , m_i обозначены скорость, радиус-вектор и масса i -го атома ансамбля. В качестве $U(\vec{r})$ обозначена полная потенциальная энергия всего ансамбля атомов, которая зависит только от радиус-вектора. Сила, действующая на каждую частицу ансамбля обозначена F_i . Потенциалы задают взаимодействие между частицами в системе. Вид потенциала определяется экспериментально. Система уравнений движения решается с помощью численных методов, при этом

используется небольшой временной шаг интегрирования dt . При этом формируется молекулярно-динамическая траектория, представляющая собой последовательность конфигураций системы, в которых указаны координаты и скорости всех атомов. Анализируя полученную траекторию, можно извлечь информацию о структурных, динамических и термодинамических характеристиках системы, подвергаемой моделированию. Так, для описания межатомных взаимодействий используются различные модели потенциальной энергии, такие как:

- Потенциал Леннарда-Джонса
- Кулоновское взаимодействие
- Потенциалы для химических связей (например, потенциалы Бонды)

В рамках представленной работы были произведены расчеты с использованием потенциала Леннарда-Джонса. Потенциал Леннарда-Джонса, также известный как потенциал “6-12”, является простой моделью, которая описывает взаимодействия между неполярными молекулами и атомами. Впервые он был предложен в 1924 году и с тех пор широко применяется в молекулярной физике и химии для моделирования взаимодействий между молекулами.

Потенциал Леннарда-Джонса (Рис. 19) имеет следующий вид:

$$U(r) = 4 \cdot \varepsilon \cdot \left(\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right), \text{ где } r - \text{ расстояние между центрами частиц, } \varepsilon -$$

глубина потенциальной ямы, σ - расстояние, при котором энергия взаимодействия равна нулю.

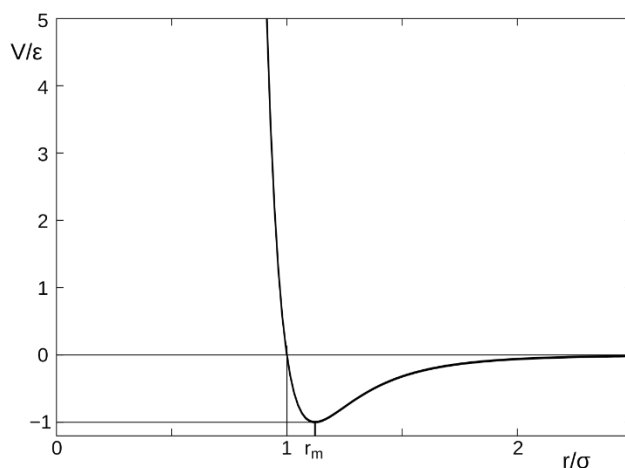


Рисунок 19. Характерный вид потенциала Леннарда-Джонса.

На рисунке 17 представлен характерный вид потенциала, его минимум лежит в точке $r_{\min} = \sigma \cdot 2^{1/6}$. При больших значениях r , молекулы притягиваются, что соответствует члену $-(\frac{\sigma}{r})^6$. Данная зависимость обусловлена диполь-дипольным индуцированным взаимодействием (силы Ван-дер-Ваальса). На малых же расстояниях молекулы отталкиваются из-за обменного взаимодействия (при перекрытии электронных облаков молекулы начинают сильно отталкиваться), чему соответствует член $(\frac{\sigma}{r})^{12}$. Данный член потенциала не имеет теоретического обоснования, но удобен в вычислениях. И это оправдывает его применение.

Метод молекулярной динамики позволяет исследовать широкий спектр молекулярных систем, включая жидкости, кристаллические структуры, белковые комплексы и биологические мембраны. Современные персональные компьютеры, оснащенные графическими процессорами (GPU), обеспечивают возможность моделирования систем из 50 000–100 000 атомов на временных промежутках до микросекунд, что стало стандартной процедурой. Однако для изучения более масштабных систем или увеличения временного диапазона моделирования до миллисекунд и более требуется применение специализированных вычислительных кластеров. Хотя процесс моделирования в рамках молекулярной динамики стал высокоавтоматизированным и

технически доступным, анализ результатов не всегда является тривиальной задачей и требует использования дополнительных инструментов/написания скриптов.

В данной работе для моделирования методом молекулярной динамики использовался программный пакет GROMACS 2021.4. С помощью данного расчетного метода была подтверждена локализация исследуемых тиосемикарбазонов в модельной липидной мембране, полученная экспериментально в ^1H ЯМР экспериментах с ядерным эффектом Оверхаузера. Топология Dp44mT была построена с использованием Automated Topology Builder [113]. Топологии AOBP и AODP были построены с использованием данных о геометрии и распределении натуральных зарядов, рассчитанных методами квантовой химии, и параметров силового поля GROMOS54a7. Квантово-химические расчеты были выполнены А.А. Дмитриевым (лаб. КХКМ ИХКГ СО РАН) в программном пакете ORCA с использованием функционала B3LYP и базисного набора def2-TZVP, начальная геометрия молекул строилась на основе рентгенографических данных, эффект сольватации (ДМСО) учитывался в рамках модели CPCM, заряды атомов получены с помощью процедуры NBO в программном комплексе Gaussian 16 (v. 7.0), для верификации расчетных структур дополнительно были проведены расчеты ИК- и УФ-спектров, а также химических сдвигов ^1H ЯМР. Для моделирования (МД) липидов использовали модель липида DMPC (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), представленная Погером и Марком [114]. Использовалась модель простого точечного заряда (SPC) молекул воды. Моделирование проводилось в ансамбле NPT с постоянным давлением (1 бар) и постоянной температурой $T = 310$ К, которые поддерживались полуизотропным баростатом Парринелло-Рамана [115] и термостатом Нозе-Гувера [116]. Для электростатических взаимодействий использовался метод PME с кубической интерполяцией четвертого порядка и сеткой 0.16 [117]. Для систем, содержащих холестерин, проводился дополнительный запуск в течение 100 нс в целях уравнивания системы. Начальная конфигурация системы содержала бислой, состоящий из 128

липидных молекул, окруженных водой (~4 000 молекул воды), и одну молекулу исследуемого тиосемикарбазона, расположенную в воде за пределами бислоя. Для всех систем производилось два цикла моделирования длительностью 550 нс каждый для АОВР, АОДР и 600 нс для DP44mT. Профили плотности для обеих молекул рассчитывались как среднее значение двух прогонов и представлялись на графиках как среднее \pm SD. Молекулы тиосемикарбазонов быстро (в первые ~30 нс) связываются с поверхностью бислоя и проникают в его внутреннюю часть. Время достижения поверхности мембраны более чем на порядок меньше длительности прогона (550 нс), поэтому небольшие различия в начальном положении молекул не оказывают существенного влияния на результат.

Полученные энергетические траектории методом молекулярной динамики и анализ ЯМР спектров спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера позволяют сделать вывод о взаимодействии изучаемых тиосемикарбазонов с модельной липидной мембраной.

Глава 3. Взаимодействие тиосемикарбазонов с липидной мембраной

Способность перспективных лекарственных молекул проникать в липидный бислой играет важную роль в их противораковой активности. Эффективность их действия зависит в том числе от глубины проникновения в клеточную мембрану [118]. Понимание распределения активного соединения в клеточной мембране и детальное представление их взаимодействия важно для разработки новых лекарственных препаратов.

В данной связи является необходимым исследование взаимодействия исследуемых тиосемикарбазонов с модельной липидной мембраной, на которое влияет комплекс факторов, включая липофильность соединений, их размер, растворимость в липидной среде, величину поверхностного заряда и другие физико-химические параметры [119].

Поскольку содержание холестерина в биологических мембранах составляет примерно 30–40% от общего числа липидов (в наружном слое плазматической мембраны холестерин может достигать до 40% всех липидов) [120], добавление холестерина (20 мол. % по отношению к концентрации фосфолипидов) в систему, моделирующую клеточную мембрану, приблизило данную модель к физиологическим условиям клеточной мембраны.

Для определения локализации исследуемых тиосемикарбазонов в модельной липидной мембране и определения влияния холестерина на их локализацию в ней был применен комплекс методов: ^1H ЯМР спектроскопия с ядерным эффектом Оверхаузера и моделирование методом молекулярной динамики.

3.1. Взаимодействие тиосемикарбазона Dp44mT с липидной мембраной

Как было упомянуто выше, среди прочих факторов липофильность и поверхностный заряд соединений влияют на их взаимодействие с липидной мембраной. При этом липофильность и заряд являются ключевыми параметрами фармацевтических агентов, определяющих их биологическую активность [121,

122]. Это иллюстрируется примером соединений класса DpT - Dp44mT [123], для которого расчетное значение $\log P$ составляет 2.19 [124, 125]. Липофильность Dp44mT коррелирует с его способностью проникать через клеточные мембраны и связывать внутриклеточные пулы железа [123], что подтверждает важность данного параметра для мембранной проницаемости. Dp44mT является полипротонным соединением, поэтому все исследования проводились при физиологическом pH 7.4, где он нейтрален [25], что способствует мембранной проницаемости.

Для анализа локализации Dp44mT в модельном липидном бислое были выполнены 1H ЯМР NOESY эксперименты с DMPC/DHPC бицеллами и моделирование методом молекулярной динамики. Результаты, полученные данными методами, обсуждаются в 3.1.1, 3.1.2.

Метод молекулярной динамики широко применяется для моделирования поведения лекарственных средств [119, 126, 127]. Однако он не позволяет эффективно моделировать тяжелые атомы, такие как железо, что исключило изучение комплекса Dp44mT-Fe в рамках данного метода. Целью привлечения расчетного метода молекулярной динамики в том числе было изучение структурных особенностей Dp44mT, которые обуславливают его взаимодействие с фосфолипидной мембраной.

3.1.1. Исследование взаимодействия Dp44mT с липидной мембраной методом ЯМР

Спектроскопия ЯМР, в частности спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY) (Глава 2, п. 2.3), является информативной и чрезвычайно чувствительной для определения распределения лекарственных препаратов в липидной мембране. Метод селективного градиентного NOESY был применен для изучения взаимодействия Dp44mT с модельной мембраной, где в качестве модели мембраны использовались небольшие изотропные бицеллы (радиус ~6 нм) DMPC/DHPC. В ходе ЯМР экспериментов было проведено селективное

возбуждение ароматических протонов тиосемикарбазона Dp44mT с последующей регистрацией сигналов на протонах липидов.

На рисунке 20 показаны скорости кросс-релаксации (сек^{-1}) между ароматическими протонами Dp44mT и фрагментами липидных молекул в отсутствие (а) и в присутствии (b) холестерина. Скорости кросс-релаксации пропорциональны интенсивностям кросс-пиков в NOESY спектрах и пропорциональны вероятности контакта насыщаемых ароматических протонов тиосемикарбазона и протонов в фрагментах липидов, с которыми данные кросс-пики наблюдаются. Описание расчета данных скоростей приведено в Главе 2, п. 2.3. Из рисунка 20а можно сделать вывод, что в отсутствие холестерина молекула Dp44mT находится преимущественно вблизи CH_2 -групп липидов (7), расположенных близко к поверхности бислоя. Добавление холестерина (Рисунок 20b) приводит к тому, что молекула Dp44mT смещается из гидрофобной части липидного бислоя ближе к гидрофильной (вблизи $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -групп на поверхности). Иными словами, холестерин выталкивает молекулу тиосемикарбазона на поверхность бислоя. Наблюдаемый эффект обусловлен влиянием холестерина на структурно-динамические свойства липидных мембран. Его включение в липидный бислой приводит к увеличению порядка ацильных цепей фосфолипидов и снижению их латеральной подвижности, что увеличивает энергетический барьер для проникновения малых молекул [84, 128, 129, 130, 131, 132].

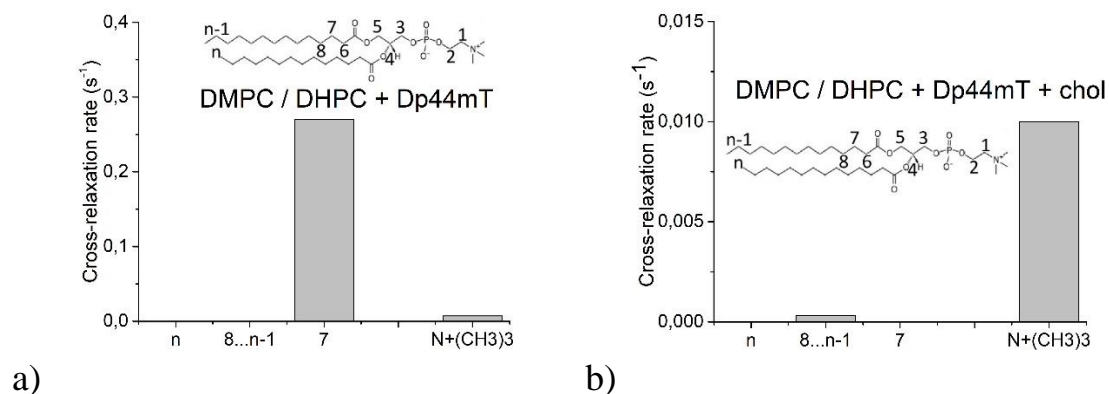


Рисунок 20. Скорости кросс-релаксации (сек^{-1}) между ароматическими протонами Dp44mT и фрагментами липидных молекул в отсутствие (а) и в

присутствии (b) холестерина. Общая концентрация липидов 12 мМ, концентрация холестерина 2.4 мМ, концентрация Dp44mT 1 мМ, pH = 7.4.

3.1.2. Моделирование взаимодействия Dp44mT с липидной мембраной методом молекулярной динамики

В целях подтверждения полученных экспериментальных результатов методом селективного градиентного NOESY и более детального понимания локализации и распределения молекулы тиосемикарабазона Dp44mT в модельной липидной мембране был привлечен расчетный метод моделирования молекулярной динамики (Глава 2, п. 2.4).

В процессе моделирования, при размещении в водной среде вне липидного бислоя, Dp44mT взаимодействовал с бислоем (Рис.21). Молекула Dp44mT быстро (в первые ~10 нс) связывалась с поверхностью липидной мембраны (Рис.21a), где оставалась в течение всего времени моделирования (600 нс).

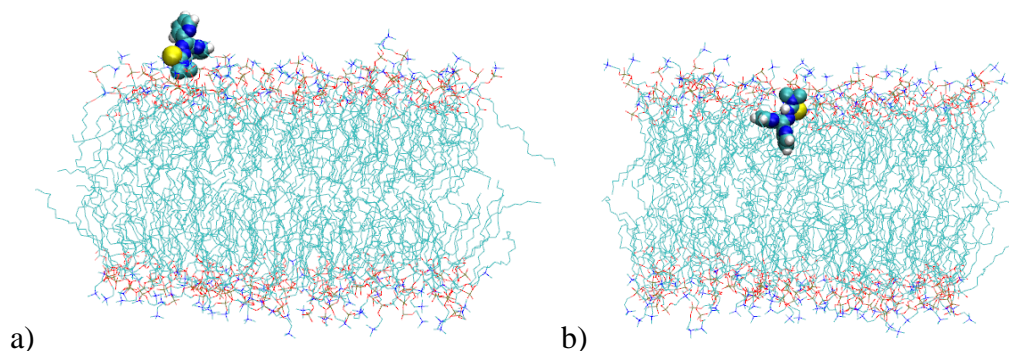


Рисунок 21. Снимки траектории Dp44mT, показывающие локализацию молекулы Dp44mT, связанного с поверхностью липидного бислоя а) снаружи - в водной среде b) внутри - в бислое. Липидный бислой состоит из DMPC липидов.

На основе молекулярно-динамических траекторий были получены профили распределения плотности молекулы Dp44mT в симуляционном боксе. Профили плотности для молекулы Dp44mT рассчитывались как среднее значение двух запусков моделирования и представлялись как $\text{среднее} \pm \text{SD}$.

Так, на рисунке 22а изображен профиль распределения плотности молекулы Dp44mT в симуляционном боксе, состоящем из DMPC липидов, где

липидной бислоем центрирован. Положение центра соответствует 3.25 нм и положения N-атомов DMPC представлены вертикальными пунктирными линиями на 1.5 и 5 нм. Согласно полученному распределению, максимум плотности молекулы Dp44mT располагается вблизи гидрофильных $N^+(CH_3)_3$ групп DMPC липидов, что говорит о преимущественном его расположении на поверхности бислоя. Полученный профиль (Рис. 22а) свидетельствует о том, что Dp44mT довольно стабильно связан с поверхностью, при этом может проникать в гидрофобную область липидной мембраны, а также находиться в водной среде. Данное поведение демонстрирует амфифильные свойства соединения, обеспечивающие его взаимодействие как с полярными головками DMPC липидов, так и с водной средой.

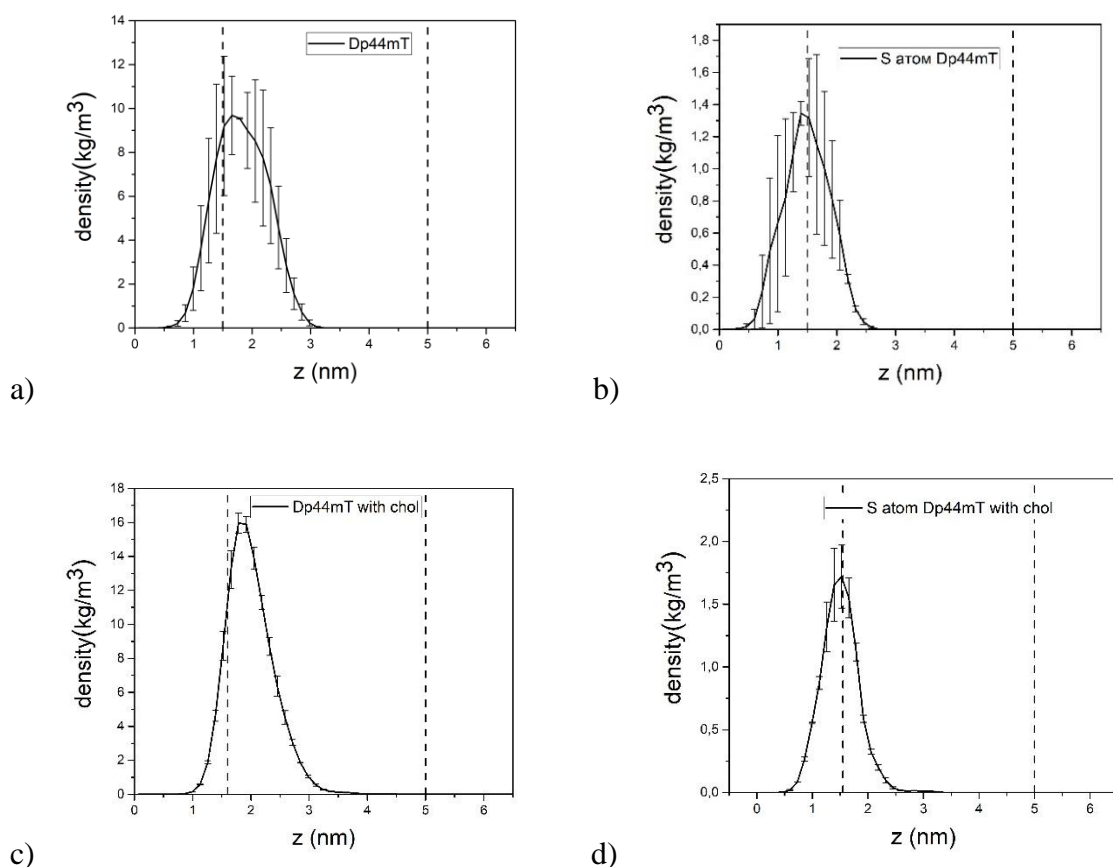


Рисунок 22. Профили распределения плотности всех атомов Dp44mT (а, с) и S атома Dp44mT (b, d) в симуляционном боксе, состоящем из DMPC липидов в отсутствие (а, b) и в присутствии (с, d) холестерина. Положения N-атомов DMPC представлены вертикальными линиями.

Полученный профиль распределения плотности атома S Dp44mT в симуляционном боксе, изображенный на рисунке 22b, демонстрирует наличие максимума распределения плотности атома S в положении $N^+(CH_3)_3$ групп DMPC, что говорит о их преимущественно близком взаиморасположении. Добавление холестерина (Рис. 22с, 22d) приводит к тому, что молекула Dp44mT смещается из гидрофобной части липидного бислоя ближе к гидрофильной (вблизи $N^+(CH_3)_3$ -групп на поверхности). Это проявляется в наблюдаемом сужении профиля распределения. Таким образом, холестерин выталкивает молекулу тиосемикарбазона на поверхность бислоя. Полученные данные моделирования отлично согласуются с ранее полученными данными. В [133] были показаны функция радиального распределения атома S Dp44mT и атома N фосфолипида DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) и расстояние между S атомом Dp44mT и N атомом фосфолипида DOPC как функция от времени. Функция радиального распределения $g(r)$, являющаяся фундаментальным параметром в молекулярной динамике, характеризует вероятность нахождения частиц в сферическом слое $[r, r+dr]$ относительно заданной центральной частицы, отражая тем самым пространственную организацию системы. Согласно приведенным данным электроотрицательный S атом Dp44mT и положительно заряженный N атом DOPC находятся на расстоянии ~ 0.4 нм в течении времени моделирования [133].

Таким образом, молекула Dp44mT продемонстрировала способность проникать в гидрофобную часть липидного бислоя, перемещаться в окружающую водную среду и возвращаться на поверхность мембраны. Полученные данные моделирования согласуются с результатами экспериментов 1H ЯМР NOESY, приведенными в 3.1.1.

Поскольку соединение Dp44mT обладает высокой проницаемостью для опухолевых клеток, данные симуляций согласуются с его экспериментально подтверждённой способностью проникать через мембраны опухолевых клеток, связывать внутриклеточные пулы железа (Fe) и выводиться из клеток [123, 134, 135, 136].

3.2. Взаимодействие тиосемикарбазона DpC с липидной мембраной

Для определения локализации тиосемикарбазона DpC в модельной липидной мембране и определения влияния холестерина на его локализацию в ней, как и в случае тиосемикарбазона Dp44mT был применен комплекс методов: ^1H ЯМР спектроскопия с ядерным эффектом Оверхаузера, а также молекулярно-динамическое моделирование.

Результаты, полученные данными методами, обсуждаются в 3.2.1, 3.2.2.

3.2.1. Исследование взаимодействия DpC с липидной мембраной методом ЯМР

На Рисунке 23 представлены скорости кросс-релаксации (с^{-1}) между ароматическими протонами DpC и сегментами липидных молекул в отсутствие (a) и в присутствии (b) холестерина. В отсутствие холестерина наблюдаются кросс-пики между ароматическими протонами DpC и гидрофобными ацильными цепями фосфолипидов (DMPC/DHPC) и полярными протонами головных групп в структуре бицелл. Это наблюдение подтверждает встраивание DpC в бицеллы DMPC/DHPC, при этом молекула динамически взаимодействует как с гидрофобными, так и с гидрофильными участками липидного ансамбля. Присутствие холестерина (20 мол.% по отношению к концентрации фосфолипида) приводило к исчезновению сигналов NOE, соответствующих концевым CH_3 -группам и CH_2 -протонам в гидрофобных ацильных цепях фосфолипидов DMPC/DHPC (рис. 23b). Это указывает на то, что холестерин вызывает структурную реорганизацию липидного бислоя, вытесняя DpC к поверхности мембраны и уменьшая его проникновение в гидрофобное ядро.

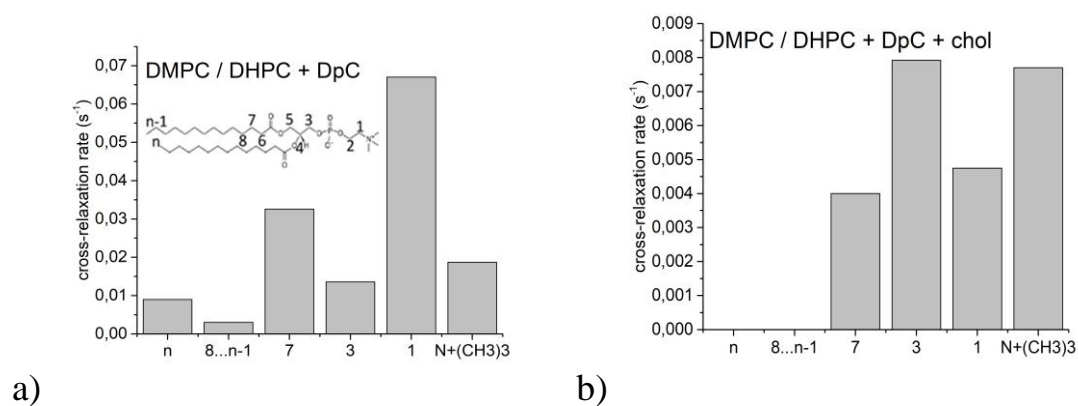


Рисунок 23. Скорости кросс-релаксации (сек⁻¹) между ароматическими протонами DpC и фрагментами липидных молекул в отсутствие (а) и в присутствии (б) холестерина. Общая концентрация липидов 12 мМ, концентрация холестерина 2.4 мМ, концентрация DpC 1 мМ, pH = 7.4.

3.2.2. Моделирование взаимодействия DpC с липидной мембраной методом молекулярной динамики

Полученные экспериментальные данные о локализации молекулы тиосемикарбазона DpC в липидной мембране подтверждаются результатами, полученными моделированием молекулярной динамики. По результатам моделирования были построены профили распределения плотности молекулы DpC в расчетном боксе. Профили плотности для молекулы DpC рассчитывались как среднее значение двух запусков моделирования и представлялись как среднее \pm SD.

На рисунке 24а представлен профиль плотности молекулы DpC в расчетном боксе, содержащем 128 молекул липида DMPC, где липидной бислой центрирован. Границы бислоя - положения N-атомов DMPC - представлены в виде вертикальных линий. Как и в случае тиосемикарбазона Dp44mT (3.1.2), максимум распределения плотности молекулы DpC располагается вблизи атомов азота гидрофильных N⁺(CH₃)₃ групп DMPC липидов, однако сам профиль уширен в сравнении с профилем распределения плотности Dp44mT (Рис. 22а). Наблюдаемое уширение профиля распределения плотности DpC и описанный результат в 3.2.1 говорит о том, что молекула динамически взаимодействует как

с гидрофобными, так и с гидрофильными фрагментами липида, что позволяет заключить о большей степени свободы молекулы DpC в липидном бислое относительно молекулы Dp44mT (3.1). В присутствии холестерина наблюдается сужение профиля плотности (Рис. 24b). Подобный эффект наблюдался и для молекулы Dp44mT (Рис. 22c). Таким образом, на рисунке 24a представлен профиль распределения плотности молекулы DpC в расчетном боксе, содержащем 128 молекул липида DMPC, а на рисунке 24b – профиль плотности молекулы DpC в присутствии холестерина в липидном бислое

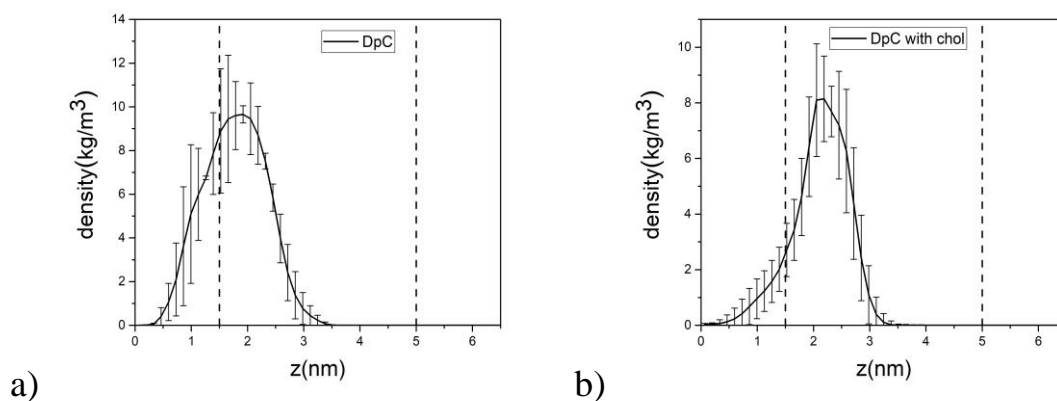


Рисунок 24. Профили распределения плотности молекулы DpC в симуляционном боксе, состоящем из DMPC липидов в отсутствие (a) и в присутствии (b) холестерина. Положения N-атомов DMPC представлены вертикальными линиями.

3.3. Взаимодействие тиосемикарбазонов AODP и АОВР с липидной мембраной

Для определения локализации новых N-акридиновых тиосемикарбазонов в модельной липидной мембране и определения влияния холестерина на их локализацию в ней, как и в случае представителей DpT поколения - тиосемикарбазонов Dp44mT, DpC, был применен комплекс методов: ^1H ЯМР спектроскопия с ядерным эффектом Оверхаузера и моделирование методом молекулярной динамики.

Результаты, полученные данными методами, обсуждаются в 3.3.1, 3.3.2.

3.3.1. Исследование взаимодействия AODP и AOBP с липидной мембраной методом ЯМР

Для изучения взаимодействия молекул тиосемикарбазонов AODP и AOBP с модельной липидной мембраной, где в качестве модели мембраны использовались небольшие изотропные бицеллы DMPC/DHPC был применен метод селективного градиентного NOESY.

Спектры ^1H ЯМР и селективного NOESY (sNOESY) AOBP и AODP в бицеллах в присутствии и отсутствие холестерина представлены на рисунке 25. Было проведено селективное возбуждение ароматических протонов AOBP и AODP с последующей регистрацией сигналов от групп протонов липидов. Общая концентрация липидов составляла 12 мМ, $T=303$ К.

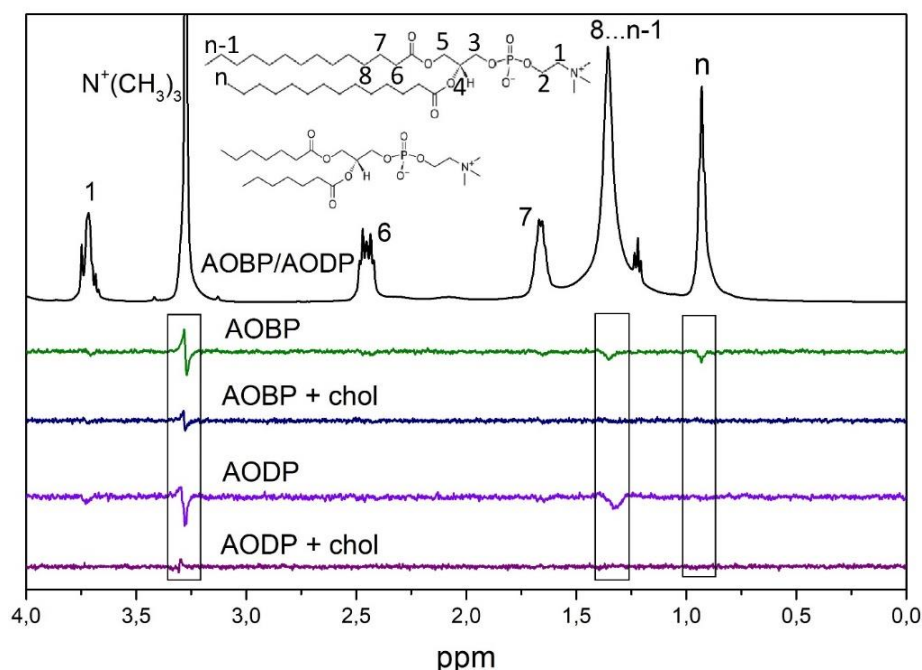


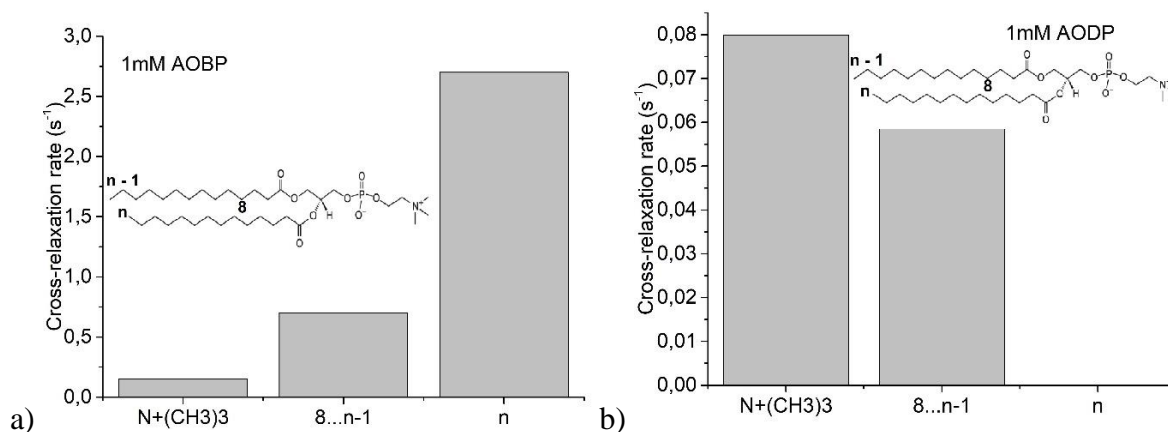
Рисунок 25. Спектры ^1H ЯМР и селективного градиентного NOESY для 1 мМ AOBP и 1 мМ AODP в бицеллах DMPC/DHPC с 2.4 мМ холестерина и без него (PBS, pH=7.4).

Наличие кросс-пиков между ароматическими протонами тиосемикарбазонов AOBP и AODP и протонами липидов указывают на встраивание этих молекул в липидный бислой. Сигнал на 3.29 ppm соответствует $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ протонам фосфолипидов DMPC/DHPC. Сигнал на 1.36 ppm

соответствует CH_2 -протонам гидрофобной цепи фосфолипидов DMPC/DHPC. Сигнал на 0.93 ppm относится к концевым CH_3 -протонам фосфолипидов DMPC/DHPC. Для молекулы АОВР наблюдались кросс-пики между ароматическими протонами АОВР и всеми протонами липидов, включая гидрофобную цепь и концевую CH_3 -группу. В случае молекулы АОДР кросс-пик с концевыми протонами CH_3 не наблюдался. Это свидетельствует о том, что молекула АОДР расположена ближе к поверхности бислоя, чем АОВР.

Добавление холестерина (20 мол. % по отношению к концентрации фосфолипидов) приводит к изменению локализации молекул АОВР и АОДР в бислое. Сигналы NOE между ароматическими протонами тиосемикарбазона и гидрофобной частью липида (протоны CH_2 и концевые CH_3) исчезают, и остается только сигнал NOE между ароматическими протонами тиосемикарбазона и протонами $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ фосфолипида. Это означает, что присутствие холестерина приводит к смещению молекул АОВР и АОДР к поверхности бислоя.

В целях количественной характеристики вероятности контакта ароматических протонов АОВР/АОДР с различными частями молекулы липида были рассчитаны скорости кросс-релаксации. Описание расчетов приведено в Главе 2, п. 2.3 Скорости кросс-релаксации для различных групп липидов представлены на рисунке 26. Поскольку скорость кросс-релаксации пропорциональна вероятности контакта с соответствующими протонами липида [112], можно сделать вывод, что молекула АОВР расположена глубже в липидном бислое, чем молекула АОДР. В присутствии холестерина обе молекулы вытесняются к поверхности бислоя.



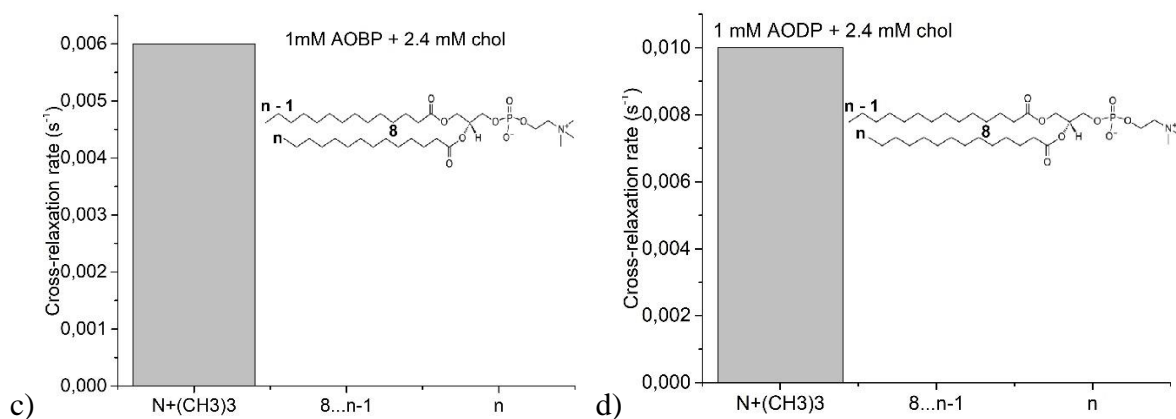


Рисунок 26. Скорости кросс релаксации (сек⁻¹) между ароматическими протонами АОВР (а, с) и АОДР (б, д) и фрагментами липидных молекул в отсутствие (а, б) и в присутствии (с, д) холестерина. Общая концентрация липидов 12 мМ, концентрация холестерина 2.4 мМ, концентрация ТСК 1 мМ, рН = 7.4.

3.3.2. Моделирование взаимодействия АОДР и АОВР с липидной мембраной методом молекулярной динамики

Полученные экспериментальные данные подтверждаются результатами молекулярно-динамического моделирования. Данные о распределении заряда и длине связей были взяты из квантово-химических расчетов геометрии молекул тиосемикарбазонов [137]. На рисунке 27 показаны рассчитанные профили плотности распределения молекул АОВР и АОДР в симуляционном боксе, в центре которого находится липидный бислой. Далее по тексту представленные профили плотности как для самих молекул, так и для их атомов серы рассчитывались как среднее значение двух запусков моделирования и представлялись как среднее \pm SD. Молекула АОВР или АОДР быстро (~30 нс) связывается с поверхностью бислоя и проникает в его внутреннюю часть. Время достижения поверхности мембраны более чем на порядок меньше длительности прогона (550 нс), поэтому небольшие различия в начальном положении молекул не оказывают существенного влияния на результат.

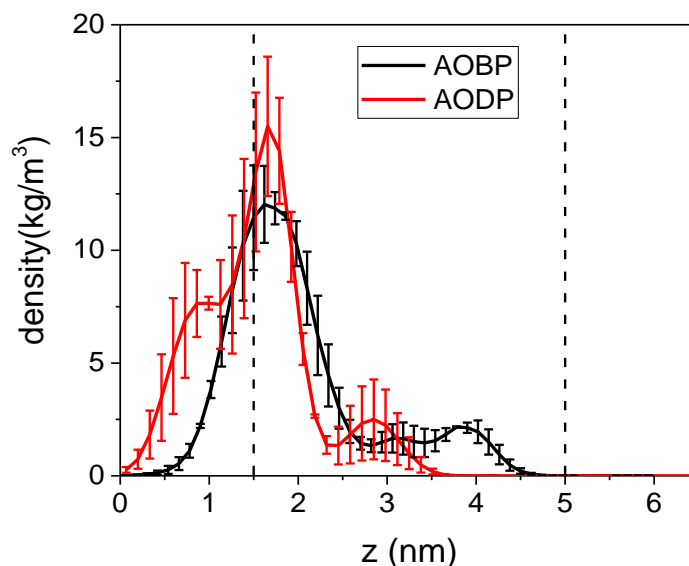


Рисунок 27. Профили распределения плотности молекул AODP и AOBP в симуляционном боксе. Положения N-атомов DMPC представлены вертикальными линиями.

Центр бислоя расположен на 3.25 нм, а положения N-атомов DMPC обозначены вертикальными черными линиями на 1.5 и 5 нм. Максимум плотности распределения AOBP расположен на 1.9 нм, а максимум плотности распределения AODP - на 1.7 нм, что смещено ближе к поверхности.

Более того, плотность распределения молекулы AODP имеет дополнительный максимум за пределами бислоя, что свидетельствует о том, что молекула AODP проводит больше времени вне бислоя. Таким образом, молекула AODP, вероятно, менее растворима в липидной мембране, чем молекула AOBP. Кроме того, плотность распределения AOBP имеет максимум (на 3.25 нм) и ненулевую плотность распределения в противоположной части бислоя, в то время как молекула AODP не проходит через центр бислоя, поскольку ее плотность распределения локализована только в одной половине бислоя (до 4 нм, тогда как центр бислоя расположен на 3.5 нм). Данное наблюдение свидетельствует о более глубоком проникновении AOBP по сравнению с AODP. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами ЯМР. На рисунке

28 представлены снимки траектории для молекул AODP и АОВР в липидном бислое.

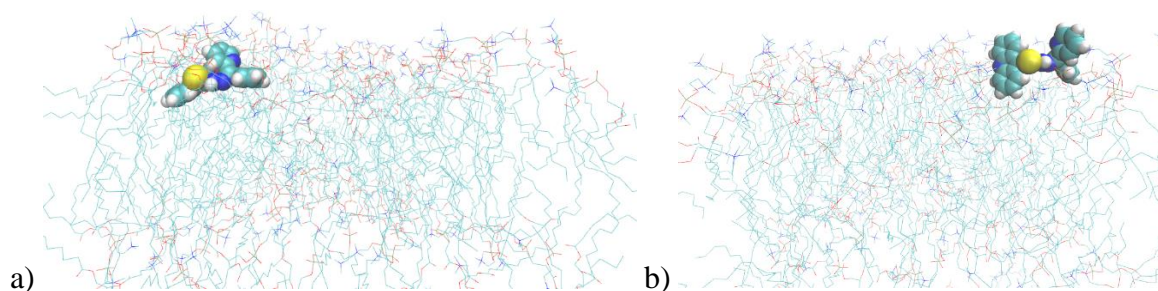


Рисунок 28. Положение (a) молекулы АОВР (b) AODP в липидном бислое.

В 3.1.2 обсуждалось, что S-атом тиосемикарбазона Dp44mT связывается с поверхностью бислоя, а именно с N-атомом в $N^+(CH_3)_3$ группе.

Для S-атомов молекул тиосемикарбазонов АОВР и AODP были построены распределения плотности в симуляционном боксе. На рисунке 29 приведены данные распределения, на которых видно, что максимумы плотности расположены вблизи поверхности бислоя для обеих молекул, но для молекулы AODP наблюдается дополнительный максимум за пределами бислоя, аналогичный распределению плотности всей молекулы. Также для обеих молекул наблюдаются дополнительные максимумы в центре бислоя, в отличие от молекулы Dp44mT. Это, указывает на лучшую способность молекул AODP и АОВР проникать через липидную мембрану в сравнении с Dp44mT.

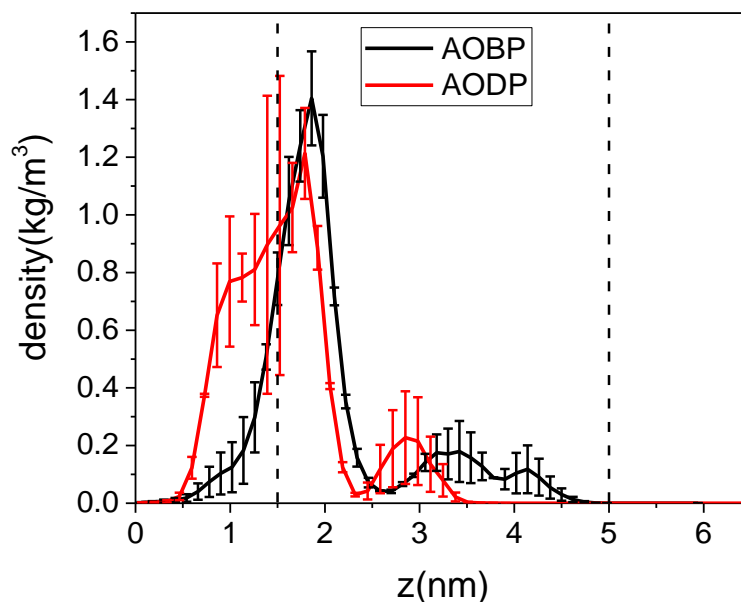


Рисунок 29. Профили распределения плотности S-атомов AODP и AOBP в симуляционном боксе. Положения N-атомов DMPC представлены вертикальными линиями.

Чтобы понять влияние холестерина на механизм взаимодействия тиосемикарбазонов с модельной липидной мембраной, было проведено моделирование с холестеринсодержащим бислоем. На рисунке 30 показаны рассчитанные профили плотности распределения молекул AOBP и AODP в симуляционном боксе в присутствии холестерина. Присутствие молекул холестерина в системе приводит к тому, что молекулы AOBP и AODP выталкиваются к поверхности липидного бислоя. Такой же эффект наблюдался для тиосемикарбазона Dp44mT. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами ЯМР спектроскопии NOESY (3.2.1).

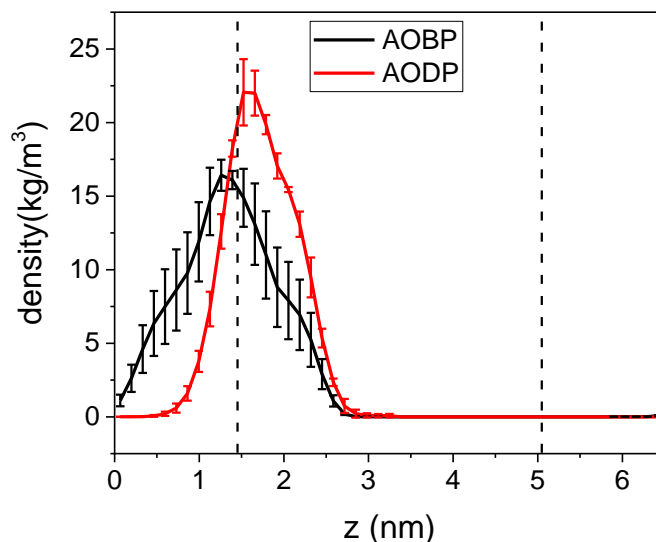


Рисунок 30. Профили распределения плотности молекул AODP и AOBP в присутствии холестерина (20 мол. % по отношению к концентрации фосфолипидов) в симуляционном боксе. Положения N-атомов DMPC представлены вертикальными линиями.

Профили плотности распределения S-атомов AOBP и AODP в присутствии холестерина приведены на рисунке 31. Максимумы плотности расположены вблизи поверхности бислоя для обеих молекул, но для молекулы AODP максимум находится ближе к внутренней части бислоя, чем для AOBP. Эти наблюдения указывают на то, что в присутствии холестерина S-атомы обеих молекул не проникают глубоко в гидрофобную область бислоя.

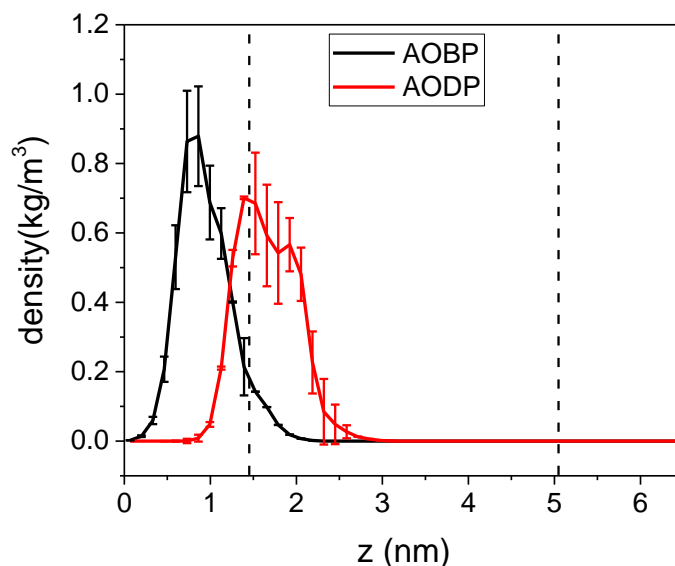
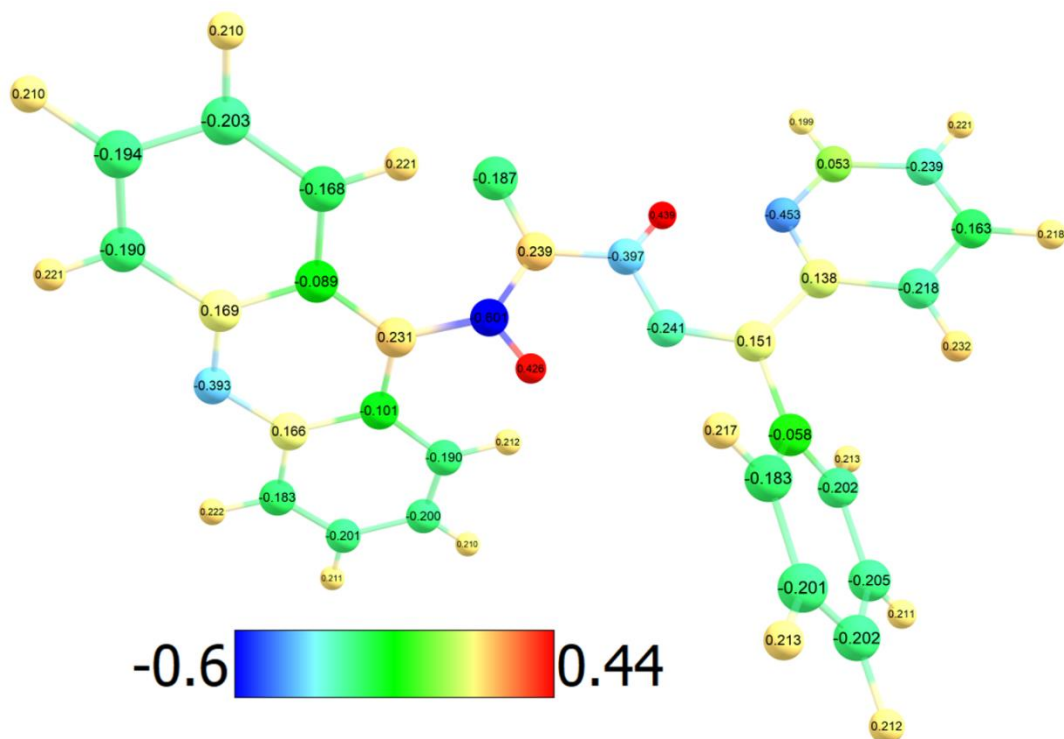


Рисунок 31. Профили распределения плотности S-атомов AODP и AOBP в присутствии холестерина (20 мол. % по отношению к концентрации фосфолипида) в симуляционном боксе. Положения N-атомов DMPC представлены вертикальными линиями.

Различия в мембранной локализации AOBP и AODP связаны с присутствием дополнительного атома азота в структуре AODP, что делает его более полярным, чем AOBP. На рисунке 32 представлены рассчитанные с помощью процедуры естественных связывающих орбиталей (NBO) естественные заряды молекул AOBP и AODP, отражающие их электронную асимметрию. Эти данные были использованы для создания топологии молекулы, необходимой для дальнейшего МД моделирования.



a)

b)

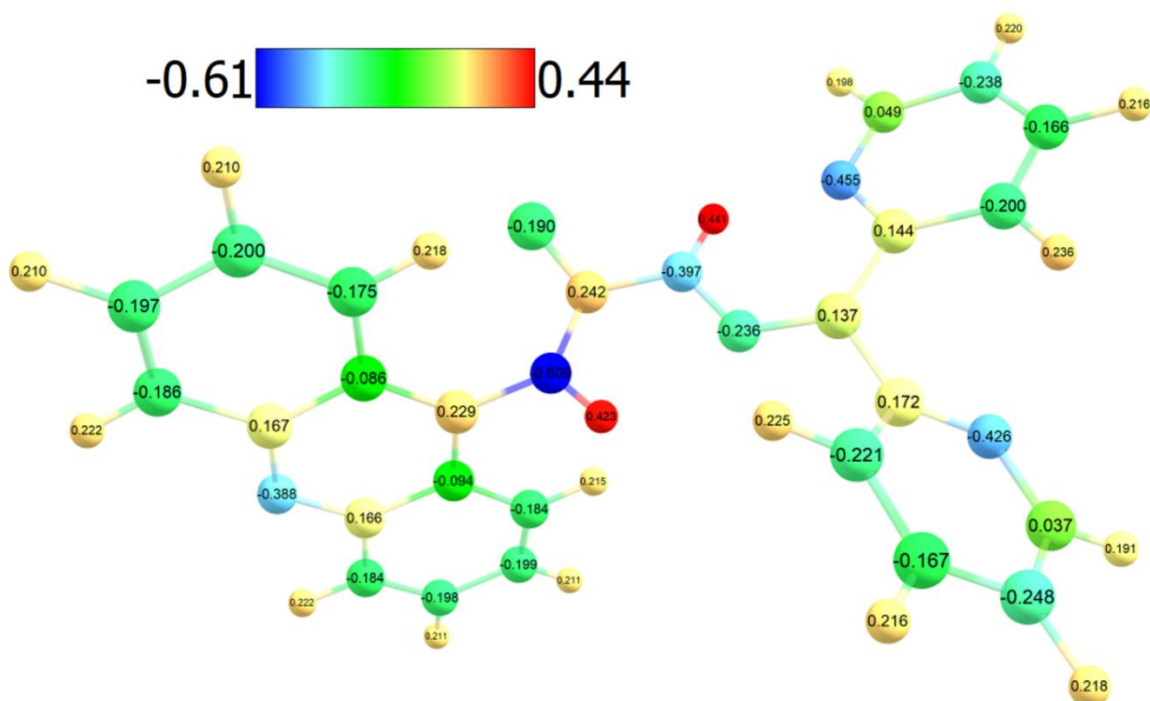


Рисунок 32. Естественные заряды а) АОВР б) АОДР, рассчитанные методом квантовой химии [137].

Наличие дополнительного азота в бипиридинском фрагменте тиосемикарбазона AODP привело к изменению распределения зарядов ближайших к азоту атомов (Рисунок 32). Это может быть причиной более низкой растворимости AODP в липидном окружении. Хотя изменения в распределении зарядов внутри молекул невелики, вероятно, наличие дополнительного отрицательного заряда в бипиридинском фрагменте AODP достаточно, чтобы значительно снизить липофильность молекулы AODP, что затрудняет ее проникновение через липидную мембрану.

Важно отметить, что полученные результаты имеют согласие с опубликованными результатами [118]. В данной работе были рассчитаны значения TPSA (Topological Polar Surface Area) для AOBP и AODP, которые составили 61,14 и 73,50 Å², соответственно. Более низкое значение TPSA обычно указывает на лучшую проницаемость мембраны, что облегчает прохождение соединения через липидный бислой. Соединения с высокими значениями TPSA более полярны и имеют более низкую проницаемость, что может ограничивать их поглощение и распределение внутри клеток.

IC₅₀ (полуМаксимальная ингибирующая концентрация) — это количественный показатель, который характеризует эффективность вещества в подавлении определённой биологической или биохимической функции. IC₅₀ определяется как концентрация вещества, необходимая для снижения активности или жизнеспособности исследуемого образца (раковых клеток) на 50% по сравнению с контролем. Данная концентрация снижала поглощение формазана наполовину, что соответствует 50% жизнеспособности клеток [122]. Так, с тиосемикарбазами AOBP и AODP был проведен МТТ (3-(4, 5-диметилтиазолил-2)-2, 5-дифенилтетразолия бромид) анализ на опухолевых клеточных линиях BE(2)-C, KELLY, SH-SY5Y и SK-N-MC. Для AOBP значения IC₅₀ составили 0.076 ± 0.016, 0.055 ± 0.009, 0.019 ± 0.003 и 0.016 ± 0.001. А для AODP значения IC₅₀ составили 0.37 ± 0.03, 0.45 ± 0.02, 0.14 ± 0.03 и 0.17 ± 0.02 [118]. Таким образом, AOBP, проникая глубже в клеточную мембрану, более эффективен против опухолевых клеток.

Заключение к главе 3.

Таким образом, было изучено взаимодействие тиосемикарбазонов Dp44mT, DpC, AODP и АОВР с модельной липидной мембраной, а также охарактеризовано влияние холестерина на локализацию этих тиосемикарбазонов в липидном бислое.

Молекула тиосемикарбазона Dp44mT, связываясь атомом серы с атомом азота гидрофильного фрагмента фосфолипида, находится на поверхности липидной мембраны как внутри бислоя, так и в водной фазе.

Молекула тиосемикарбазона DpC встраивается в бицеллы DMPC/DHPC, при этом динамически взаимодействует как с гидрофобными, так и с гидрофильными участками липидного ансамбля.

Тиосемикарбазоны АОВР и AODP способны проникать в липидную мембрану, но их локализация различается. АОВР проникает глубже в гидрофобную внутреннюю часть мембраны, чем молекула AODP. Такие различия в локализации АОВР и AODP внутри мембраны могут быть обусловлены наличием дополнительного атома азота в структуре AODP, что приводит к изменению зарядов ближайших атомов. Это может быть причиной более низкой растворимости AODP в липидной мембране. Результаты, полученные с использованием комбинации методов ^1H ЯМР с ядерным эффектом Оверхаузера и молекулярного динамического моделирования, хорошо коррелируют с недавно опубликованными данными [118]. Более низкое значение TPSA АОВР по сравнению с AODP подтверждает лучшее проникновение через мембрану. Примечательно, что значения IC₅₀ для АОВР ниже, чем для AODP, в опухолевых клеточных линиях BE(2)-C, KELLY, SH-SY5Y и SK-N-MC [118]. Это означает, что АОВР, проникая глубже в клеточную мембрану, более эффективен против опухолевых клеток.

Также было отмечено влияние холестерина на локализацию тиосемикарбазонов в модельной липидной мембране. В присутствии холестерина все исследованные тиосемикарбазоны вытесняются на поверхность бислоя, покидая его гидрофобную область. Это указывает на то, что холестерин

вызывая структурную реорганизацию липидного бислоя, вытесняет молекулы пролекарств на поверхность мембраны и уменьшает их проникновение в гидрофобное ядро за счет увеличения порядка липидов и их плотности упаковки.

Глава 4. Участие хелатных комплексов тиосемикарбазонов в реакции перекисного окисления липидов

Индукцированное железом образование активных форм кислорода способно инициировать процессы перекисного окисления липидов биологических мембран, что характерно для патологических состояний, сопровождающихся избытком железа [138, 139]. Данный окислительный процесс вызывает дестабилизацию структурной организации липидного бислоя [61, 140], что может модифицировать его барьерные свойства [140, 141]. Окислительный стресс, с одной стороны, рассматривается как фактор, способствующий прогрессии опухолевого роста [52, 142], а с другой - служит мишенью при разработке противоопухолевых стратегий [143, 144]. Среди АФК, индуцирующих перекисное окисление липидов, выделяют супероксид-анион ($O_2^{\cdot-}$), пероксильный (ROO^{\cdot}), гидроксильный ($\cdot OH$) радикалы и пероксид водорода (H_2O_2), взаимодействующие с полиненасыщенными жирными кислотами [145]. Наибольшей реакционной способностью обладает гидроксильный радикал, образование которого катализируется ионами железа в ходе реакций Фентона и Хабера-Вейсса [146, 147].

В данной работе в качестве модельной системы для исследования окислительно-восстановительной активности комплексов в реакции перекисного окисления липидов использовались мицеллы линолевой кислоты и бицеллы DLPC/DHPC. Образцы были приготовлены по методике, описанной в главе 2 “Объекты и методы исследования”. Перекись водорода была выбрана в качестве модельного окислителя.

Линолевая кислота является полиненасыщенной жирной кислотой и ее перекисное окисление описано в литературе [148, 149]. В этой связи она была выбрана для исследования инициации перекисного окисления липидов. Окисление LA в концентрации 3.5 mM проводилось в избытке H_2O_2 , концентрация которой составляла 0.5 M, в присутствии $FeSO_4$ (0.1 mM) при температуре 20 °C и при фиксированном pH = 7.4.

На Рисунке 33 представлен ^1H ЯМР спектр исходной линолевой кислоты (LA) в реакционной смеси при $\text{pH} = 7.4$, а также спектры этой смеси спустя 2, 4 и 24 часа при температуре 20°C с H_2O_2 и FeSO_4 . Сигнал на 2.7 ppm соответствует бис-аллильным протонам линолевой кислоты. На стадии инициации перекисного окисления LA из этого места происходит отрыв атома H, что приводит к уменьшению интенсивности соответствующего сигнала как функции от времени. Это уменьшение связано с формированием сопряженных диенов и липидных радикалов (см. реакцию (2), п. 2.2.).

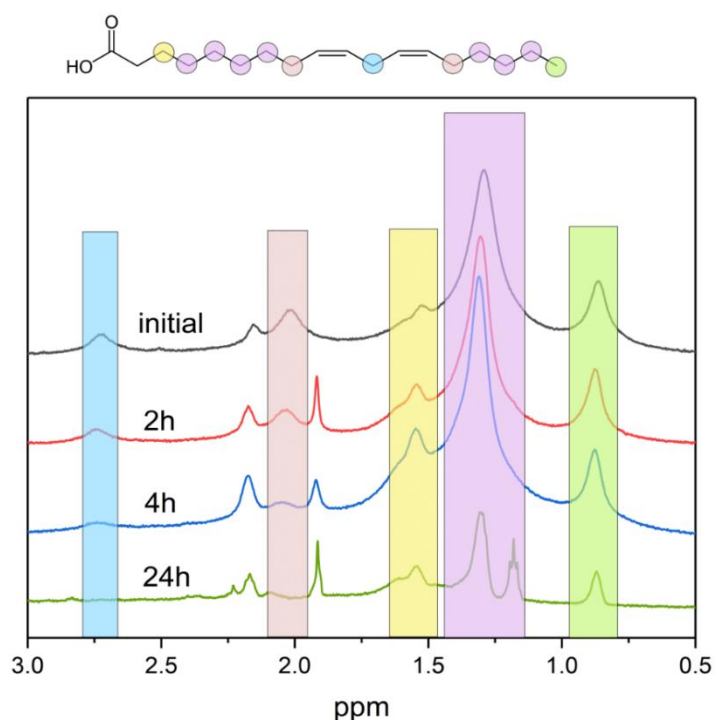


Рисунок 33. ^1H ЯМР спектры исходного раствора линолевой кислоты (3.5 mM), а также линолевой кислоты (3.5 mM), в реакционной смеси с H_2O_2 (0.5 M) и FeSO_4 (0.1 mM) спустя 2, 4 и 24 ч времени при температуре 20°C ($\text{pH} = 7.4$).

Отрыв бис-аллильного атома H приводит к формированию $\text{L}\cdot$ с новыми конъюгированными двойными связями, что в итоге приводит к полному исчезновению бис-аллильного протона в структуре продуктов. Уменьшение интенсивности сигнала ^1H NMR при 0.8 ppm соответствует метильным протонам и может происходить из-за образования димерных продуктов (см. уравнение (4), п. 2.2.). Эти продукты, вероятно, имеют ограниченное движение из-за своего размера и невидимы в ^1H ЯМР спектрах раствора. Увеличение интенсивности

сигнала при 1.6 ppm может быть вызвано образованием продуктов присоединения кислорода, таких как 9,10-12,13-диэпоксиоктадеканоат. Однако этот сигнал трудно проанализировать из-за уширения линии и перекрывания с другими сигналами. Контрольный эксперимент в смеси линолевой кислоты в присутствии Fe(II) и в отсутствии H₂O₂ не демонстрирует уменьшения интенсивности сигналов от LA в спектре в течение 24 часов при 20 °C.

Наряду с изученной модельной системой мицелл линолевой кислоты в контексте перекисного окисления липидов (Рис. 8, Рис. 9, Рис. 18, Таблица 1, Таблица 2) липидные бицеллы служат ещё одной перспективной моделью клеточной мембраны. В отличие от мицелл, бицеллы формируют упорядоченный бислой, максимально приближенный к естественной структуре биологических мембран, что делает их идеальным объектом для исследований методами ¹H ЯМР [80]. Эта система не только воспроизводит физиологическую организацию липидов, но и позволяет детально анализировать молекулярные взаимодействия в условиях, имитирующих реальную клеточную среду. Их малый размер обеспечивает высокую разрешающую способность метода, открывая новые возможности для детального анализа динамики мембранных процессов [80].

В рамках данной работы окислительно-восстановительная активность Dp44mT была исследована в бицеллах, состоящих из DLPC и DHPC фосфолипидов в отношении 2:1. Бис-аллильные протоны, которые принимают участие в реакции инициации, имеются только у DLPC фосфолипидов в модели DLPC/DHPC бицелл. На рисунке 34 изображены спектр исходного раствора DLPC/DHPC фосфолипидов с общей концентрацией 12 mM и спектры DLPC/DHPC в реакционной смеси с H₂O₂ (0.5 M) и FeSO₄ (0.1 mM) спустя 2 и 24 часа времени при температуре 20°C и при фиксированном pH = 7.4. Как и в случае с линолевой кислотой, ЯМР сигнал на 2.7 ppm соответствует бис-аллильным протонам DLPC фосфолипида. На этапе инициации перекисного окисления происходит отрыв атома H из этого положения, что приводит к постепенному уменьшению интенсивности сигнала со временем (Рисунок 34).

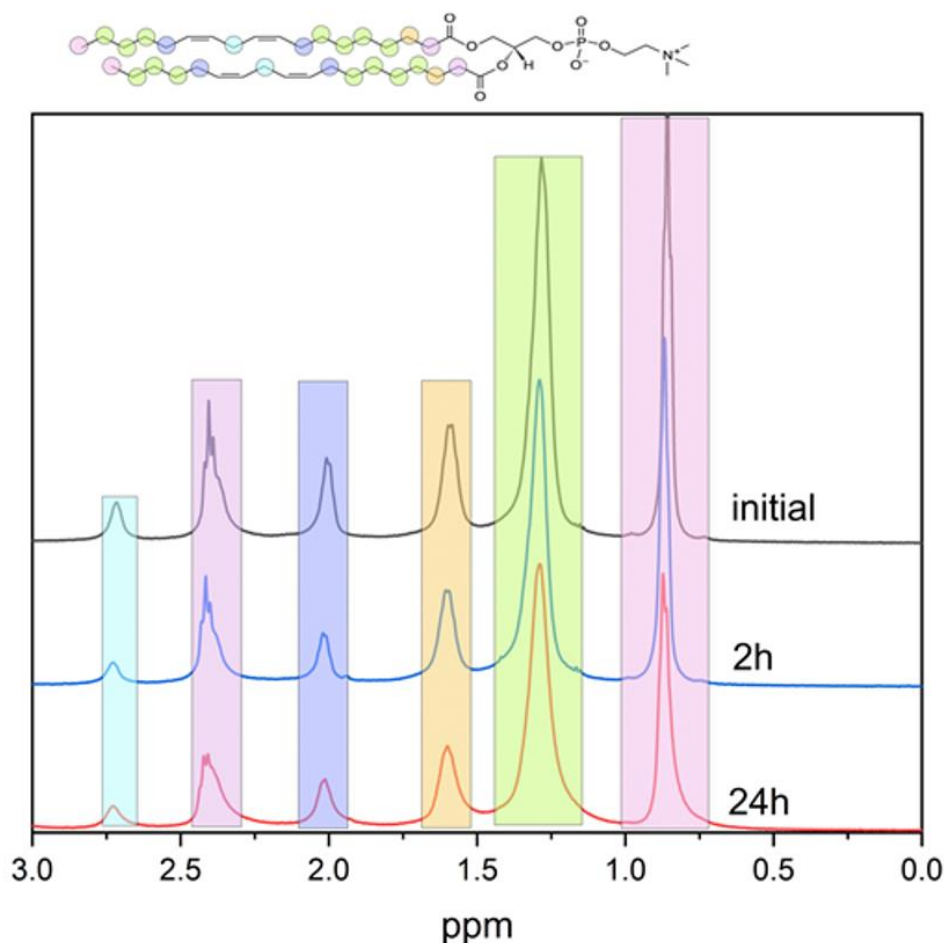


Рисунок 34. ^1H ЯМР спектры исходного раствора DLPC/DHPC фосфолипидов (общая концентрация 12 мМ), а также DLPC/DHPC в реакционной смеси с H_2O_2 (0.5 М) и FeSO_4 (0.1 мМ) спустя 2 и 24 ч времени при температуре 20°C ($\text{pH} = 7.4$).

Таким образом, в экспериментах наблюдался спад интенсивности ^1H ЯМР сигнала на 2.7 ppm. Это явление связано с со стадией инициации окисления линолевой кислоты и фосфолипида DLPC.

Данная глава посвящена изучению влияния тиосемикарбазонов на Fe-индуцированные реакции перекисного окисления липидов.

4.1. Редокс-активность комплекса Fe-Dp44mT в реакции перекисного окисления липидов

Окислительно-восстановительная активность комплекса Fe-Dp44mT в реакции перекисного окисления липидов в присутствии и отсутствие природного

антиоксиданта аскорбиновой кислоты была исследована в мицеллах линолевой кислоты и бицеллах DLPC/DHPC. Реакция запускалась модельным окислителем H_2O_2 (0.5 M).

4.1.1. Реакции в мицеллах линолевой кислоты

Графики зависимости интегральной интенсивности ^1H ЯМР сигнала на 2.7 ppm от времени в реакции с ионами железа и H_2O_2 в отсутствие и в присутствии Fe-Dp44mT в отсутствие, и в присутствии 2.5 mM аскорбиновой кислоты представлены на Рисунке 35. Данные графики отражают кинетики реакций инициации перекисного окисления мицелл линолевой кислоты в отсутствие и в присутствии Dp44mT (a) без аскорбата, либо (b) с 2.5 mM аскорбата. Исследования перекисного окисления проводили при 20°C с использованием суспензии мицелл линолевой кислоты, состоящей из 3.5 mM линолевой кислоты, 0.5 M H_2O_2 , 0.1 mM FeSO_4 (pH 7.4), 1 mM Dp44mT или 1 mM комплекса $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ в PBS (pH 7.4). Графики отображают спад интегральной интенсивности ^1H ЯМР сигналов от бисаллильных протонов линолевой кислоты в зависимости от времени. $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ представляет собой выделенный комплекс, структурная формула которого показана на Рисунке 13 (справа). Стехиометрия комплекса 2:1, т.е. 2 лиганда Dp44mT на один атом железа. Образец $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]$ изначально представляет собой смесь лиганда Dp44mT и FeSO_4 .

Расчет наблюдаемой константы скорости реакции инициации проводился путем аппроксимации данного спада экспоненциальной зависимостью (Таблица 1).

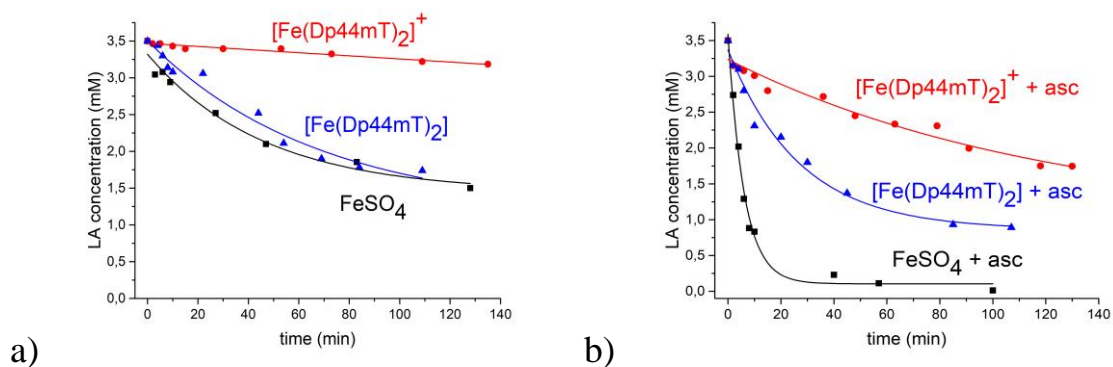


Рисунок 35. Графики зависимости интегральной интенсивности ^1H ЯМР сигнала бисалилльного протона линолевой кислоты на 2.7 ppm от времени в реакции инициации перекисного окисления мицелл линолевой кислоты в отсутствие и в присутствии Dp44mT (a) без аскорбата, либо (b) с 2.5 mM аскорбата.

В отсутствие Dp44mT наблюдаемое окисление LA соответствует уравнениям (1)-(4). Учитывая, что реакция протекает в избытке H_2O_2 , переход $\text{Fe}(\text{II})$ в $\text{Fe}(\text{III})$ происходит за миллисекунды на первой стадии за счет реакции (1). Константа скорости этой реакции составляет $63 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [150, 151]. Предполагается, что лимитирующей стадией окисления LA является переход $\text{Fe}(\text{III})$ в состояние $\text{Fe}(\text{II})$ в соответствии с реакцией (6), которая протекает с константой скорости $0,0027 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [150, 151].

В отсутствие аскорбата $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]$ показал наблюдаемую константу скорости инициации перекисного окисления мицелл линолевой кислоты в 7.6 раз больше наблюдаемой константы скорости инициации перекисного окисления с $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ (Таблица 1). Наблюдаемая константа скорости реакции с $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ в 10.9 раз меньше относительно контроля с нехелатированным $\text{Fe}(\text{II})$ и линолевой кислотой без участия Dp44mT. Эти данные, наряду с кинетиками на рисунке 35a, подчеркивают низкую окислительно-восстановительную активность $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ в сравнении с другими условиями эксперимента.

Добавление аскорбата в систему с $\text{Fe}(\text{II})$ (в форме FeSO_4) увеличивает наблюдаемую константу скорости инициации перекисного окисления линолевой кислоты в 7.5 раз по сравнению с контрольными условиями без аскорбата

(Таблица 1, Рис. 35). Наблюдаемый эффект объясняется ускоренным переходом Fe(III) в Fe(II), описанным в уравнении 5 (п. 2.2.). Данный переход при участии аскорбиновой кислоты поддерживает высокую активность железа в окислительно-восстановительных циклах. При добавлении аскорбата $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ показал значение наблюдаемой константы скорости в 3.9 раз большее, а $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]$ в 2.2 раза большее, чем без добавления аскорбата. Заметно, что рост наблюдаемой константы скорости реакции в случае $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]$ менее выражен, чем в случае $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ (Таблица 1). В присутствии аскорбата, Fe и лиганда Dp44mT наблюдаемая константа скорости реакции окисления линолевой кислоты была значительно меньше, чем в случае контроля Fe(II) (Таблица 1, Рис. 35b). Это указывает на ингибирующий эффект Dp44mT в реакции инициации перекисного окисления.

Таблица 1. Величины наблюдаемых скоростей реакций инициации перекисного окисления мицелл линолевой кислоты, индуцированной комплексом $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ и смесью Fe + Dp44mT, относительно контроля (т.е. Fe (II), добавленного в виде FeSO₄) в присутствии и отсутствии аскорбата (2.5 мМ).

Образец	Наблюдаемая скорость реакции ($\times 10^{-4}\text{сек}^{-1}$)		
	Контроль Fe(II)	$[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$	$[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]$
В отсутствие аскорбиновой кислоты	3.6 ± 0.8	0.33 ± 0.03	2.5 ± 0.3
В присутствии аскорбиновой кислоты	27.0 ± 0.4	1.3 ± 0.2	5.6 ± 0.4

Эксперименты проводились в естественном содержании молекулярного кислорода (образцы не продувались инертным газом). Образцы с $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]$ являлись свежеприготовленными с Fe(II) в виде FeSO₄, однако в ходе экспериментов не было предпринято попыток предотвратить окисление до

Fe(III), которое, происходит в присутствии кислорода в растворе. В этой связи вероятно, что значительная часть этих комплексов может находиться в окисленном состоянии Fe(III). Данный факт важно учитывать при интерпретации результатов при добавлении аскорбиновой кислоты.

4.1.2. Реакции в бицеллах DLPC/DHPC

Кинетики реакций инициации перекисного окисления DLPC/DHPC бицелл в отсутствие и в присутствии Dp44mT (a) без аскорбата, либо (b) с 2.5 мМ аскорбата представлены на Рисунке 36. Исследования перекисного окисления проводили при 20°C с использованием суспензии бицелл DLPC/DHPC, состоящей из 4 мМ DLPC, 8 мМ DHPC, 0.5 М H₂O₂, 0.1 мМ FeSO₄ (Fe(II)) или вместо FeSO₄ 1 мМ комплекса [Fe(Dp44mT)₂]⁺ или смеси Fe + Dp44mT в PBS (pH 7.4). Графики отображают спад интегральной интенсивности ¹H ЯМР сигналов от бисалильного протона DLPC липида на 2.7 ppm в зависимости от времени.

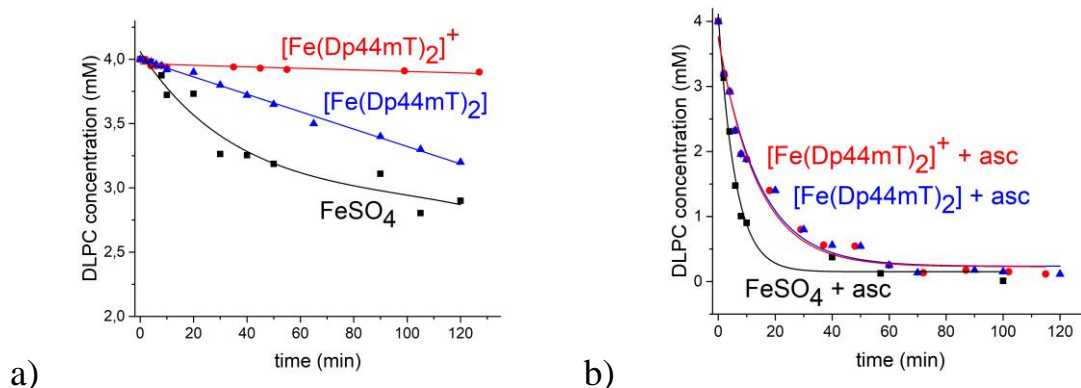


Рисунок 36. Графики зависимости интегральной интенсивности ¹H ЯМР сигнала бисалильного протона липида DLPC на 2.7 ppm от времени в реакции инициации перекисного окисления DLPC/DHPC бицелл в отсутствие и в присутствии Dp44mT (a) без аскорбата, либо (b) с 2.5 мМ аскорбата.

В Таблице 2 приведены величины наблюдаемых скоростей реакций инициации перекисного окисления липидов, кинетики которых приведены на Рисунке 36.

В отсутствие хелатирующего лиганда Dp44mT константы скорости реакций инициации окисления бицелл DLPC/DHPC демонстрировали близкие значения к аналогичным параметрам в системе мицелл линолевой кислоты (2.1.1). Это наблюдение справедливо как для условий с добавлением аскорбиновой кислоты, так и без неё (Таблица 2), что указывает на схожий базовый механизм окисления в обеих системах при использовании незахелатированного Fe(II) в качестве контроля. Однако добавление Dp44mT приводило к принципиальному расхождению в кинетике окисления между мицеллами и бицеллами. Таким образом, Dp44mT в зависимости от типа липидной системы меняет окислительно – восстановительное поведение железа — от каталитического усиления окисления до его ингибирования.

Как и в случае мицелл линолевой кислоты, в отсутствие аскорбиновой кислоты $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ не демонстрирует окислительно-восстановительной активности, ингибируя реакцию перекисного окисления бицелл DLPC/DHPC, в отличие от т.н. контрольной реакции с незахелатированным Fe(II) (Таблица 2, Таблица 1). Однако в отличие от случая с мицеллами, где $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]$ проявлял редокс активность в отсутствие аскорбиновой кислоты, в случае перекисного окисления бицелл DLPC/DHPC $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]$ полностью подавляет реакцию перекисного окисления, не проявляя окислительно-восстановительной активности (Таблица 2, Таблица 1). Таким образом, редокс-функция Fe-Dp44mT не универсальна и в том числе определяется микроокружением.

Добавление аскорбиновой кислоты привело к резкому увеличению наблюдаемых констант скорости реакций перекисного окисления, что продемонстрировало её выраженное прооксидантное действие. Как видно из данных Таблицы 2, для комплексов $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]$ и $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ значения констант скорости увеличились в 43 и 550 раз соответственно. Наиболее значительный рост наблюдался для Fe(III)-содержащей формы, что объясняется быстрым восстановлением Fe(III) до Fe(II) в структуре лиганда Dp44mT под влиянием аскорбата. Этот переход, катализируемый восстановительной

активностью аскорбиновой кислоты, существенно усиливает реакционную способность комплексов, ускоряя процессы окисления. Таким образом, аскорбат выступает не только как антиоксидант в физиологических условиях, но и проявляет прооксидантные свойства в присутствии металлосодержащих систем, что подчеркивает его двойственную роль в окислительно-восстановительных реакциях.

Таблица 2. Величины наблюдаемых скоростей реакций инициации перекисного окисления бицелл DLPC/DHPC, индуцированной комплексом $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ и смесью Fe + Dp44mT, относительно контроля (т.е. Fe (II), добавленного в виде FeSO_4) в присутствии и отсутствии аскорбата (2.5 mM).

Образец	Наблюдаемая скорость реакции ($\times 10^{-4}\text{сек}^{-1}$)		
	Контроль Fe(II)	$[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$	$[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]$
В отсутствии аскорбиновой кислоты	4 ± 1	0.02 ± 0.01	0.30 ± 0.05
В присутствии аскорбиновой кислоты	26 ± 6	11 ± 3	13 ± 2

Атом серы в структуре Dp44mT (Рис.13 слева) представляет собой один из трёх координационных центров, теряющих способность к взаимодействию после образования комплекса с железом (Рис. 13 справа). Полученные данные о контакте S атома Dp44mT с N атомом DOPC/DMPC фосфолипида методом молекулярной динамики (1.1.2) дают возможное объяснение сниженной перекисной активности комплекса $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]$ в DLPC/DHPC бицеллях по сравнению с мицеллами линолевой кислоты (Таблицы 1, 2).

Таким образом, Dp44mT демонстрирует различную перекисную активность в бицеллях и мицеллах. А аскорбиновая кислота усиливает окисление линолевой кислоты в мицеллах (Таблица 1), но не в бицеллях (Таблица 2), что

может объясняться различиями во взаимодействии с фосфолипидами, которые не содержатся в мицеллах линолевой кислоты.

4.1.3. Роль аскорбиновой кислоты в редокс-активности Fe-Dp44mT

Для детального анализа влияния аскорбиновой кислоты на редокс-активность комплексов Fe-Dp44mT в экспериментах был применен метод оптической спектроскопии - метод, позволивший в режиме реального времени отследить динамику электронных переходов, восстановление Fe(III) до Fe(II) и сопутствующие изменения в спектрах поглощения, что стало ключом к расшифровке молекулярных механизмов прооксидантного действия аскорбата.

На рисунке 37 изображены оптический спектр для смеси 0.05 мМ FeSO₄ и 0.1 мМ Dp44mT, предварительно выдержанной в течение часа, и оптический спектр 0.05 мМ комплекса [Fe(Dp44mT)₂]⁺ в фосфатно-солевом буфере. pH поддерживался одинаковым 7.4 для всех образцов. Данные спектры похожи, за исключением наличия максимума на 320 нм, который соответствует свободному Dp44mT [152]. Таким образом, со временем в образце, содержащем смесь 0.05 мМ FeSO₄ и 0.1 мМ Dp44mT, образуется комплекс [Fe(Dp44mT)₂]⁺.

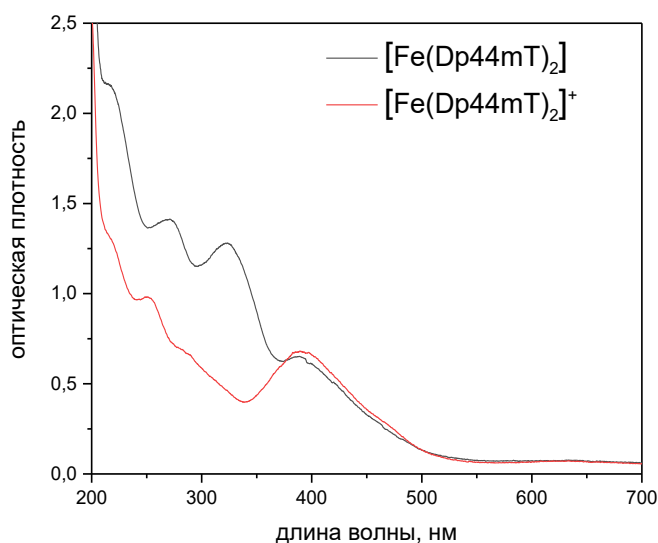


Рисунок 37. Оптические спектры поглощения образцов при 20°C, содержащих FeSO₄ (0.05 мМ), Dp44mT (0.1 мМ) и 0.05 мМ комплекса [Fe(Dp44mT)₂]⁺.

При записи оптических спектров смеси 0.1 мМ FeSO₄ и 0.05 Dp44mT сразу после смешивания и через промежутки времени в течение 2 часов наблюдался следующий эффект: падение интенсивности пика на 620 нм (Рисунок 38). Согласно [152], данный пик соответствует комплексу [Fe(Dp44mT)₂]. Данное наблюдение указывает на окисление комплекса [Fe(Dp44mT)₂] до состояния Fe(III) под действием кислорода. На основании этих наблюдений можно предложить следующую реакцию [153]:

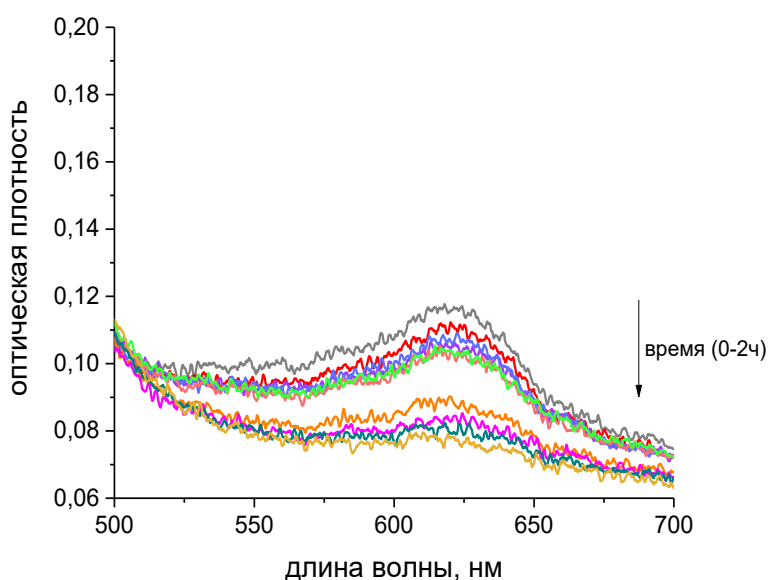
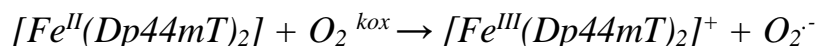


Рисунок 38. Оптические спектры поглощения образцов, содержащих 0.1 мМ FeSO₄ и 0.05 Dp44mT в течение 2 часов после смешивания.

При добавлении аскорбиновой кислоты к данному образцу [Fe(Dp44mT)₂] после выдерживания, снова возникает дополнительный пик на 620 нм (Рисунок 39), интенсивность которого растет с ростом концентрации аскорбиновой кислоты. Аскорбиновая кислота имеет только максимум поглощения на 250 нм, и комплекс [Fe(Dp44mT)₂]⁺ также не имеет поглощения в данной области (Рисунок 37). Аналогичный результат – рост интенсивности максимума поглощения на 620 нм в присутствии аскорбиновой кислоты – наблюдался для комплексов [Fe(Dp44mT)₂] (Рисунок 40).

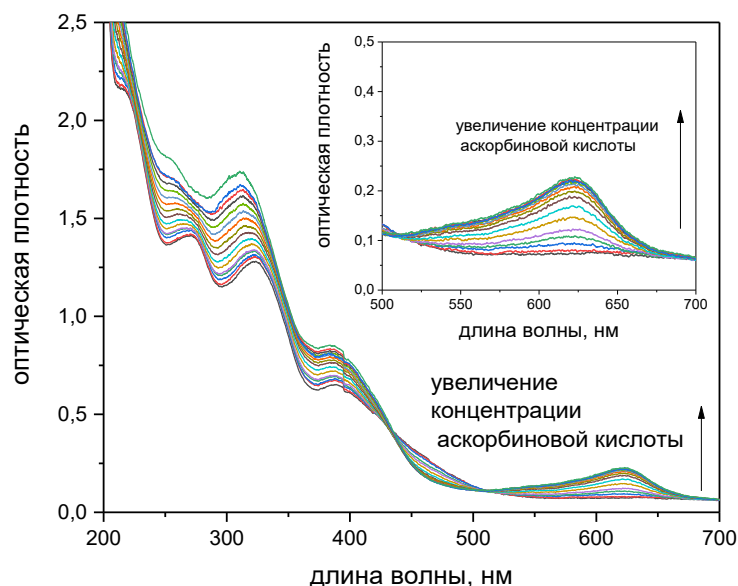


Рисунок 39. Оптические спектры поглощения образцов при 20°C, содержащих FeSO_4 (0.05 мМ), Dp44mT (0.1 мМ) и аскорбат в диапазоне концентраций (0-0.8 мМ) в PBS (pH 7.4).

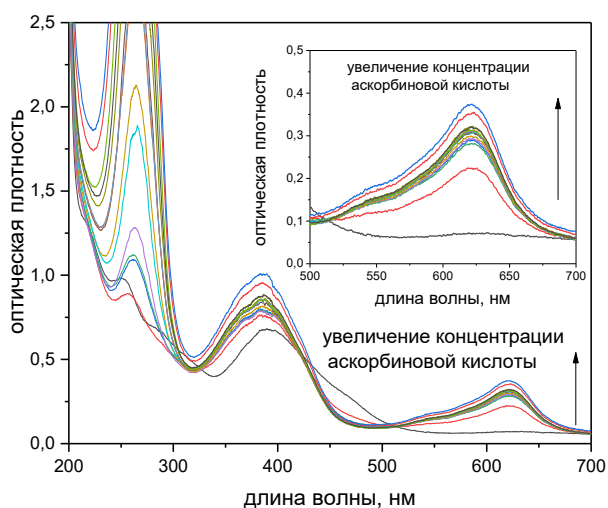
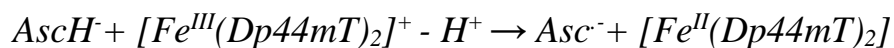


Рисунок 40. Оптические спектры поглощения образцов при 20°C, содержащих 0.05 мМ комплекса $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ и аскорбиновую кислоту в диапазоне концентраций 0-0.8 мМ.

Полученные результаты могут означать, что даже в смеси $\text{Fe(II)} + \text{Dp44mT}$ комплекс $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ является доминирующим, а в присутствии аскорбиновой кислоты протекает следующая реакция:



Таким образом, хотя доминирующая форма комплекса в растворе – это комплекс с менее реакционноспособным Fe(III), аскорбиновая кислота восстанавливает Fe(III) до Fe(II). Это объясняет появление окислительной активности комплексов $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ в мицеллах и в бицеллах в присутствии аскорбиновой кислоты.

Исходя из полученных данных, повышение окислительной активности комплексов Dp44mT с ионами железа в присутствии аскорбиновой кислоты происходит благодаря циклической окислительно-восстановительной реакции, схема которой представлена на рисунке 41.

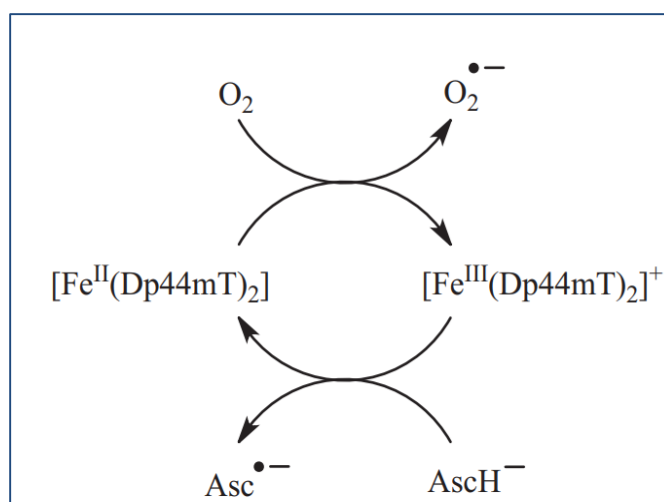


Рисунок 41. Окислительно-восстановительная реакция комплекса Fe-Dp44mT с аскорбиновой кислотой.

Проводились также эксперименты для изучения влияния аскорбата (0.2 mM) на Dp44mT (0.1 mM) в растворе, не содержащем ионов железа (Рис. 42). Добавление аскорбата приводило к значительному росту оптической плотности на длине волны 265 нм, что согласуется с литературными данными о положении максимума поглощения аскорбата [154]. Примечательно, что после инкубации в течение 1 часа при 20°C изменений в исходном спектре обнаружено не было (Рис. 42). Это означает, что аскорбиновая кислота не вступает в реакцию с лигандом.

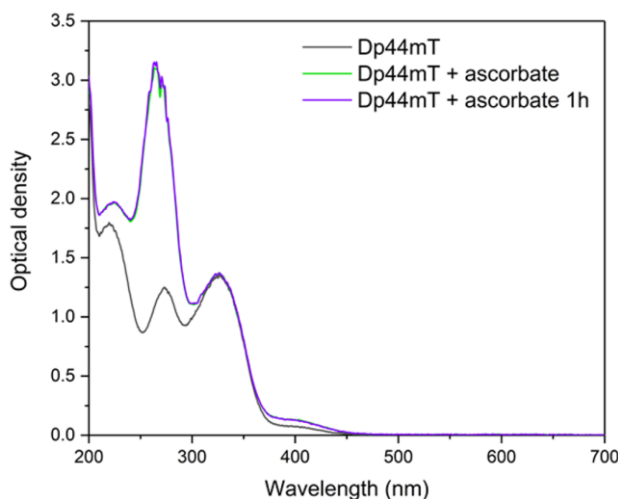


Рисунок 42. Оптические спектры поглощения образцов, содержащих 0.1 mM Dp44mT, 0.1 mM Dp44mT и 0.2 mM аскорбиновой кислоты сразу после смешивания, 0.1 mM Dp44mT и 0.2 mM аскорбиновой кислоты спустя 1 час после смешивания.

Совокупность данных, представленных на рис. 39-42, продемонстрировала, что влияние аскорбата специфично именно для комплекса Fe, а не лиганда Dp44mT, и обусловлено способностью аскорбата восстанавливать $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Dp44mT})_2]^+$ до $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Dp44m})_2]$.

4.2. Редокс-активность комплекса $[\text{Fe}(\text{DpC})_2]^+$ в реакции перекисного окисления липидов

$[\text{Fe}(\text{DpC})_2]^+$ представляет собой выделенный комплекс, структурная формула которого показана на Рисунке 15 (справа). Стехиометрия комплекса 2:1, т.е. 2 лиганда DpC на один атом железа. Кинетика перекисного окисления линолевой кислоты (3.5 mM) в реакции с H_2O_2 (0.5 M) была измерена для Fe(III)-комплексов DpC ($[\text{Fe}(\text{DpC})_2]^+$) в отсутствие или в присутствии аскорбата (2.5 mM). Полученные экспериментальные точки аппроксимировали экспоненциальным спадом, а наблюдаемую константу скорости получали в результате подгонки параметров с помощью алгоритма Левенберга-Марквардта в программе Origin 2017. Рассчитанные константы скорости реакции представлены в таблице 3.

На рисунке 43 представлены кинетики реакций инициации перекисного окисления мицелл линолевой кислоты в присутствии $[\text{Fe}(\text{DpC})_2]^+$ (а) без аскорбата, (б) с 2.5 мМ аскорбата. Исследования перекисного окисления проводили при 20°C с использованием суспензии мицелл линолевой кислоты, состоящей из 3.5 мМ линолевой кислоты, 0.5 М H_2O_2 , 1 мМ комплекса $[\text{Fe}(\text{DpC})_2]^+$ в PBS (pH 7.4). Графики отображают спад интегральной интенсивности ^1H ЯМР сигналов от протонов линолевой кислоты на 2.7 ppm в зависимости от времени.

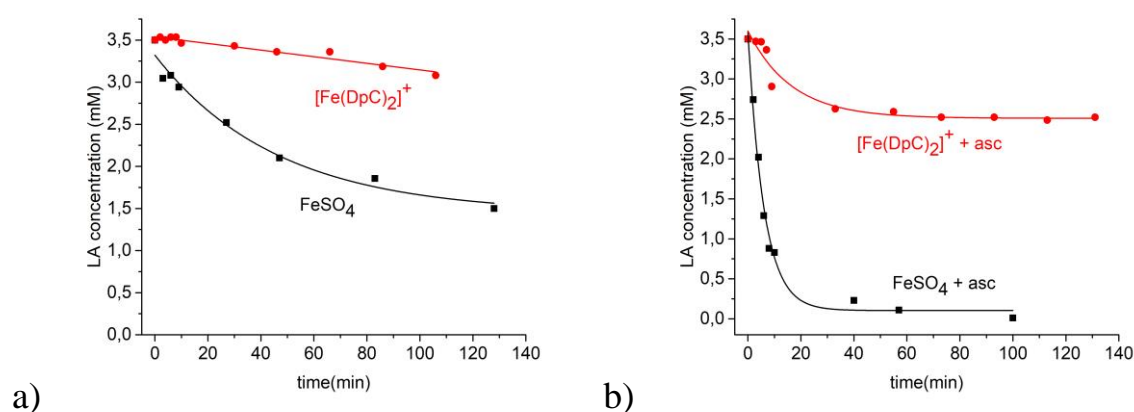


Рисунок 43. Графики зависимости интегральной интенсивности ^1H ЯМР сигнала бисалильного протона линолевой кислоты на 2.7 ppm от времени в реакции инициации перекисного окисления мицелл линолевой кислоты в присутствии $[\text{Fe}(\text{DpC})_2]^+$ (а) без аскорбата, (б) с 2.5 мМ аскорбата.

Таблица 3. Величины наблюдаемых констант скорости реакции инициации перекисного окисления мицелл линолевой кислоты, индуцированной комплексом $[\text{Fe}(\text{DpC})_2]^+$ относительно контроля (т.е. Fe (II), добавленного в виде FeSO_4) в присутствии и отсутствии аскорбата (2.5 mM).

Образец	Наблюдаемая скорость реакции ($\times 10^{-4}\text{сек}^{-1}$)	
	Контроль Fe(II)	$[\text{Fe}(\text{DpC})_2]^+$
В отсутствии аскорбиновой кислоты	3.6 ± 0.8	Реакция не идет
В присутствии аскорбиновой кислоты	27.0 ± 0.4	10 ± 3

При добавлении аскорбата $[\text{Fe}(\text{DpC})_2]^+$ показал значение наблюдаемой константы скорости более, чем в 15 раз большее, чем без добавления. Окислительно-восстановительная активность $[\text{Fe}(\text{DpC})_2]^+$ в этой системе сопоставима с таковой для комплексов $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ (4.1.1. Таблица 1).

4.3. Редокс-активность комплекса $[\text{Fe}(\text{АОВР})_2]^+$ в реакции перекисного окисления липидов

$[\text{Fe}(\text{АОВР})_2]^+$ представляет собой выделенный комплекс, структурная формула которого показана на Рисунке 16 (слева). Стехиометрия комплекса 2:1, т.е. 2 лиганда АОВР на один атом железа. Как было описано ранее для хелатных комплексов тиосемикарбазонов Dp44mT (пункт 4.1.1) и DpC (пункт 4.2), была измерена кинетика перекисного окисления линолевой кислоты (3.5 mM) в реакции с H_2O_2 (0.5 M) для Fe(III)-комплексов АОВР ($[\text{Fe}(\text{АОВР})_2]^+$) в отсутствие или в присутствии аскорбата (2.5 mM).

На рисунке 44 представлены кинетики реакций инициации перекисного окисления мицелл линолевой кислоты в отсутствие и в присутствии

$[\text{Fe}(\text{AOBP})_2]^+$ (a) в отсутствие аскорбата, (b) в присутствии 2.5 мМ аскорбата при 20°C.

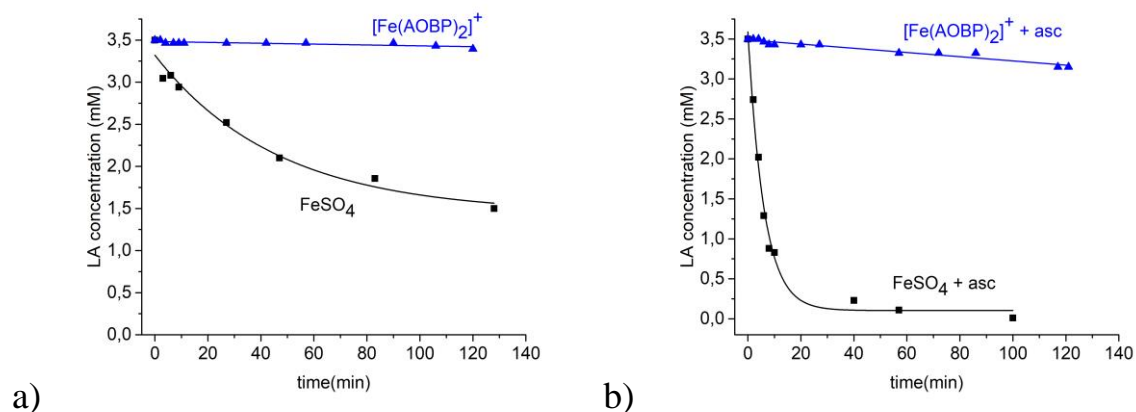


Рисунок 44. Графики зависимости интегральной интенсивности ^1H ЯМР сигнала бисалилльного протона линолевой кислоты на 2.7 ppm от времени в реакции инициации перекисного окисления мицелл линолевой кислоты в присутствии $[\text{Fe}(\text{AOBP})_2]^+$ (a) без аскорбата, (b) с 2.5 мМ аскорбата..

Полученные кинетики демонстрируют, что комплекс $[\text{Fe}(\text{AOBP})_2]^+$ не проявляет окислительной активности как в присутствии аскорбиновой кислоты, так и в ее отсутствие. Наблюдаемые константы скорости реакции приведены в Таблице 4. Отсутствие влияния аскорбиновой кислоты может быть связано со стерическими затруднениями, препятствующими переносу электрона между аскорбатом и атомом железа в составе комплекса.

Таблица 4. Величины наблюдаемых констант скорости реакции инициации перекисного окисления мицелл линолевой кислоты, индуцированной комплексом $[\text{Fe}(\text{АОВР})_2]^+$ относительно контроля (т.е. Fe (II), добавленного в виде FeSO_4) в присутствии и отсутствии аскорбата (2.5 мМ).

Образец	Наблюдаемая скорость реакции ($\times 10^{-4}\text{сек}^{-1}$)	
	Контроль Fe(II)	$[\text{Fe}(\text{АОВР})_2]^+$
В отсутствии аскорбиновой кислоты	3.6 ± 0.8	Реакция не идет
В присутствии аскорбиновой кислоты	27.0 ± 0.4	0.44 ± 0.03

Тиосемикарбазон АОДР обладает заметно худшей растворимостью, как в воде, так и в мицеллах линолевой кислоты. В этой связи не удалось получить и корректно обработать данные по его окислительно-восстановительной активности.

Таким образом, была исследована окислительно-восстановительная активность тиосемикарбазона в реакциях инициации перекисного окисления мицелл линолевой кислоты в присутствии и отсутствие аскорбиновой кислоты.

Заключение к главе 4.

Исследована окислительно-восстановительная активность комплексов с Fe(III). Было показано, что комплекс $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ проявляет редокс-активность только в присутствии аскорбиновой кислоты, которая восстанавливает его до $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]$, инициируя циклические окислительно-восстановительные реакции. При этом комплекс $[\text{Fe}(\text{DpC})_2]^+$ проявляет более высокую редокс активность в данной системе. В отличие от этих двух комплексов, комплекс $[\text{Fe}(\text{АОВР})_2]^+$ не активен ни в присутствии, ни в отсутствие аскорбиновой кислоты, предположительно, из-за стерического

фактора, который препятствует переносу электрона между атомом железа и аскорбиновой кислотой. Согласно литературным данным, комплекс $[\text{Fe}(\text{AOBP})_2]^+$ проявляет слабую антипролиферативную активность как по сравнению с чистым лигандом, так и по сравнению с Dp44mT, DpC и их комплексами. Низкая активность данного комплекса в реакции перекисного окисления липидов может быть одной из причин данных различий.

Основные результаты и выводы

1. Тиосемикарбазоны di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT), di-2-pyridylketone-4-cyclohexyl-4-methyl-3-thiosemicarbazone (DpC), 2-benzoyl ((E)-N-(acridin-9-yl)-2-(phenyl(pyridin-2-yl)methylene)hydrazine-1-carbothioamide (АОВР) и 2-dipyridyl ((E)-N-(acridin-9-yl)-2-(di(pyridin-2-yl)methylene)hydrazine-1-carbothioamide (AODP) способны проникать в липидную мембрану. Установлена их локализация в модельной липидной мембране. При этом АОВР может находиться в контакте с концевыми CH_3 -группами молекул липида, находящимися в центре гидрофобной области бислоя, в то время как AODP не способен проникать в центр бислоя. Молекула тиосемикарбазона Dp44mT, связываясь атомом серы с атомом азота гидрофильного фрагмента фосфолипида, находится на поверхности липидной мембраны как внутри бислоя, так и в водной фазе. В отличие от Dp44mT, молекула тиосемикарбазона DpC способна проникать глубже в бислой, динамически взаимодействуя как с гидрофобными, так и с гидрофильными участками липида.

2. В присутствии холестерина (20 мол. % по отношению к концентрации фосфолипидов) в составе модельного липидного бислоя, который вызывает его реорганизацию, все исследованные тиосемикарбазоны вытесняются на поверхность липидной мембраны, покидая ее гидрофобную область.

3. В реакции инициации перекисного окисления липидов комплекс $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ не продемонстрировал окислительно-восстановительную активность в отсутствие аскорбиновой кислоты. В присутствии аскорбиновой кислоты комплексы Dp44mT с ионами железа редокс активны. При этом хелатный комплекс DpC показал более высокую редокс активность в данной системе относительно всех исследуемых комплексов. Fe содержащий комплекс АОВР не продемонстрировал окислительно-восстановительной активности ни в отсутствие, ни в присутствие аскорбиновой кислоты, предположительно, из-за стерического фактора.

4. Аскорбиновая кислота восстанавливает $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]^+$ до $[\text{Fe}(\text{Dp44mT})_2]$, участвуя в циклической окислительно-восстановительной реакции.

Благодарности

Выражаю глубочайшую благодарность и искреннюю признательность своему научному руководителю и вдохновителю, кандидату физико-математических наук Ольге Юрьевне Селютиной, за постановку научных задач, постоянное внимание к работе, неоценимые консультации и всестороннюю поддержку на всех этапах исследования.

Особую признательность приношу доктору химических наук, заведующему лаборатории Магнитных явлений ИХКГ СО РАН, Николаю Эдуардовичу Полякову, за поддержку, помощь в планировании работы и глубокий анализ результатов.

Искренне благодарен научной группе профессора Ричардсона за любезно предоставленные химические соединения, ставшие объектом данного исследования.

Выражаю признательность кандидату физико-математических наук А.А. Дмитриеву (лаб. КХКМ ИХКГ СО РАН) за проведение квантово-химических расчетов геометрии и распределения зарядов для тиосемикарбазонов АОВР и АОДР.

Глубокую благодарность адресую Новосибирскому государственному университету и кафедре биомедицинской физики физического факультета за оказанную поддержку и творческую атмосферу.

Также благодарю всех коллег лаборатории Магнитных явлений ИХКГ СО РАН за творческую атмосферу и моральную поддержку.

Отдельные слова глубочайшей признательности и любви адресую своим родителям и семье за неизменную поддержку, понимание и терпение на протяжении всего времени работы над диссертацией.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? / B. Halliwell, J. M. Gutteridge, C. E. Cross // *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 1992. – Т. 119. – Free radicals, antioxidants, and human disease. – № 6. – P. 598-620.
2. Kontoghiorghes, G. J. Prospects for introducing deferiprone as potent pharmaceutical antioxidant / G. J. Kontoghiorghes // *Frontiers in Bioscience*. – 2009. – Т. 1. – № 1. – P. 161-178.
3. Afanas'ev, I. B. Superoxide and nitric oxide in pathological conditions associated with iron overload: the effects of antioxidants and chelators / I. B. Afanas'ev // *Current Medicinal Chemistry*. – 2005. – Т. 12. – Superoxide and nitric oxide in pathological conditions associated with iron overload. – № 23. – P. 2731-2739.
4. Reuter, S. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? / S. Reuter, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi, B. B. Aggarwal // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2010. – Т. 49. – Oxidative stress, inflammation, and cancer. – № 11. – P. 1603-1616.
5. Sinha, B. K. Free radicals in anticancer drug pharmacology / B. K. Sinha // *Chemico-Biological Interactions*. – 1989. – Т. 69. – № 4. – P. 293-317.
6. Lu, B. The Role of Ferroptosis in Cancer Development and Treatment Response / B. Lu, X. B. Chen, M. D. Ying et al. // *Frontiers in Pharmacology*. – 2018. – Т. 8. – № 992.
7. Jung, M. Iron as a Central Player and Promising Target in Cancer Progression / M. Jung, C. Mertens, E. Tomat, B. Brüne // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Т. 20. – № 2. – P. 273.
8. Салихов, И. Г. Перекисное окисление липидов и его значение в патологии внутренних органов / И.Г. Салихов, К.Н. Агишева // *Казанский медицинский журнал*. – 1986. – Т. 67. – № 3. – С. 200-203.
9. Feng, S. The mechanism of ferroptosis and its related diseases / S. Feng, D. Tang, Y. Wang et.al. // *Molecular Biomedicine*. – 2023. – Т. 4. – № 1. – P. 33.
10. Lei, P. Mechanisms of Ferroptosis and Relations With Regulated Cell Death: A Review / P. Lei, T. Bai, Y. Sun // *Frontiers in Physiology*. – 2019. – Т. 10. – № 139. – P. 139.
11. Yoshimura, Y. Effects of Buffer Solutions and Chelators on the Generation of Hydroxyl Radical and the Lipid Peroxidation in the Fenton Reaction System / Y. Yoshimura, Y. Matsuzaki, T. Watanabe et al. // *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. – 1992. – Vol. 13. – № 3. – P. 147-154.
12. Zhang, Y. A critical review of the application of chelating agents to enable Fenton and Fenton-like reactions at high pH values / Y. Zhang, M. Zhou // *Journal of Hazardous Materials*. – 2019. – Т. 362. – P. 436-450.

13. Timmins, G. S. Free radical formation in murine skin treated with tumour promoting organic peroxides / G. S. Timmins, M. J. Davies // *Carcinogenesis*. – 1993. – T. 14. – № 8. – P. 1499-1503.
14. Martemucci, G. Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health / G. Martemucci, C. Costagliola, M. Mariano et al. // *Oxygen*. – 2022. – Vol. 2. – № 2. – P. 48-78.
15. Meegan, M. J. Special Issue “Anticancer Drugs 2021” / M. J. Meegan, N. M. O’Boyle // *Pharmaceuticals*. – 2022. – Vol. 15. – № 4. – P. 479.
16. Thelander, L. Mechanism of inhibition of mammalian ribonucleotide reductase by the iron chelate of 1-formylisoquinoline thiosemicarbazone. Destruction of the tyrosine free radical of the enzyme in an oxygen-requiring reaction. / L. Thelander, A. Gräslund // *Journal of Biological Chemistry*. – 1983. – Vol. 258. – № 7. – P. 4063-4066.
17. Kalinowski, D. S. Thiosemicarbazones: the new wave in cancer treatment / D. S. Kalinowski, P. Quach, D. R. Richardson // *Future Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 1. – № 6. – P. 1143-1151.
18. Richardson, D. R. 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones are Potent Iron Chelators and Antiproliferative Agents: Redox Activity, Iron Complexation and Characterization of their Antitumor Activity / D. R. Richardson, D. S. Kalinowski, V. Richardson et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 52. – № 5. – P. 1459-1470.
19. Dikalov, S. Role of iron ion chelation by quinones in their reduction, OH-radical generation and lipid peroxidation / S. Dikalov, P. Alov, D. Rangelova // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1993. – T. 195. – № 1. – P. 113-119.
20. Menasché, P. Iron chelation by deferoxamine inhibits lipid peroxidation during cardiopulmonary bypass in humans / P. Menasché, H. Antebi, L. G. Alcindor et al. // *Circulation*. – 1990. – T. 82. – № 5 Suppl. – P. 390-396.
21. Yoshida, Y. Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron / Y. Yoshida, S. Furuta, E. Niki // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 1993. – T. 1210. – № 1. – P. 81-88.
22. Alegría, A. E. Structural and hydrophilicity requirements in quinone-induced lipid peroxidation of phosphatidylcholine vesicles / A. E. Alegría, G. and Santiago // *Toxicological & Environmental Chemistry*. – 1998. – T. 65. – № 1-4. – P. 185-202.
23. Markova, I. D. Light-Stimulated Generation of Free Radicals by Quinones-Chelators / I. D. Markova, N. E. Polyakov, O. Y. Selyutina et al. // *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. – 2017. – Vol. 231. – № 2. – P. 369-389.
24. Stacy, A. E. Zinc(II)–Thiosemicarbazone Complexes Are Localized to the Lysosomal Compartment Where They Transmetallate with Copper Ions to Induce Cytotoxicity / A. E. Stacy, D. Palanimuthu, P. V. Bernhardt et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 59. – № 10. – P. 4965-4984.
25. Lovejoy, D. B. Antitumor Activity of Metal-Chelating Compound Dp44mT Is Mediated by Formation of a Redox-Active Copper Complex That Accumulates in

- Lysosomes / D. B. Lovejoy, P. J. Jansson, U. T. Brunk et al. // *Cancer Research*. – 2011. – Vol. 71. – № 17. – P. 5871-5880.
26. Rozanova Torshina, N. Catalytic therapy of cancer with porphyrins and ascorbate / N. Rozanova Torshina, J. Z. Zhang, D. E. Heck // *Cancer Letters*. – 2007. – T. 252. – № 2. – P. 216-224.
27. Hadi, S. M. Catalytic therapy of cancer by ascorbic acid involves redox cycling of exogenous/endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species / S. M. Hadi, M. F. Ullah, U. Shamim et al. // *Chemotherapy*. – 2010. – T. 56. – № 4. – P. 280-284.
28. Heffeter, P. Anticancer Thiosemicarbazones: Chemical Properties, Interaction with Iron Metabolism, and Resistance Development / P. Heffeter, V. F. S. Pape, É. A. Enyedy et al. // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2019. – T. 30. – Anticancer Thiosemicarbazones. – № 8. – P. 1062-1082.
29. Santiago, E. D. F. Evaluation of the Anti-Schistosoma mansoni Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles / E. D. F. Santiago, S. A. De Oliveira, G. B. De Oliveira Filho et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2014. – Vol. 58. – № 1. – P. 352-363.
30. Glinma, B. Trypanocidal and cytotoxic evaluation of synthesized thiosemicarbazones as potential drug leads against sleeping sickness / B. Glinma, S. D. S. Kpoviessi, F. A. Gbaguidi et al. // *Molecular Biology Reports*. – 2014. – Vol. 41. – № 3. – P. 1617-1622.
31. Magalhaes Moreira, D. R. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death / D. R. Magalhaes Moreira, A. D. T. De Oliveira, P. A. Teixeira De Moraes Gomes et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol. 75. – P. 467-478.
32. Yu, D. The Transcriptional Repressor Bcl-6 Directs T Follicular Helper Cell Lineage Commitment / D. Yu, S. Rao, L. M. Tsai et al. // *Immunity*. – 2009. – Vol. 31. – № 3. – P. 457-468.
33. Da Silva, A. P. Antitumor activity of (-)- α -bisabolol-based thiosemicarbazones against human tumor cell lines / A. P. Da Silva, M. V. Martini, C. M. A. De Oliveira et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2010. – Vol. 45. – № 7. – P. 2987-2993.
34. Vandresen, F. Novel R-(+)-limonene-based thiosemicarbazones and their antitumor activity against human tumor cell lines / F. Vandresen, H. Falzirolli, S. A. Almeida Batista et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol. 79. – P. 110-116.
35. Shyamsivappan, S. A novel 8-nitro quinoline-thiosemicarbazone analogues induces G1/S & G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis through ROS mediated mitochondrial pathway / S. Shyamsivappan, R. Vivek, A. Saravanan et al. // *Bioorganic Chemistry*. – 2020. – Vol. 97. – P. 103709.

36. Maqbool, S. N. Overcoming tamoxifen resistance in oestrogen receptor-positive breast cancer using the novel thiosemicarbazone anti-cancer agent, DPC / S. N. Maqbool, S. C. Lim, K. C. Park et al. // *British Journal of Pharmacology*. – 2020. – Vol. 177. – № 10. – P. 2365-2380.
37. Kalinowski, D. S. The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer / D. S. Kalinowski, D. R. Richardson // *Pharmacological Reviews*. – 2005. – Vol. 57. – № 4. – P. 547-583.
38. Jansson, P. J. The iron complex of Dp44mT is redox-active and induces hydroxyl radical formation: an EPR study / P. J. Jansson, C. L. Hawkins, D. B. Lovejoy, D. R. Richardson // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2010. – T. 104. – № 11. – P. 1224-1228.
39. Malarz, K. The role of oxidative stress in activity of anticancer thiosemicarbazones / K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Serda et al. // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9. – № 25. – P. 17689-17710.
40. Mrozek-Wilczkiewicz, A. Iron chelators in photodynamic therapy revisited: synergistic effect by novel highly active thiosemicarbazones / A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Serda, R. Musiol et al. // *ACS medicinal chemistry letters*. – 2014. – T. 5. – № 4. – P. 336-339.
41. Mrozek-Wilczkiewicz, A. Iron Chelators and Exogenic Photosensitizers. Synergy through Oxidative Stress Gene Expression / A. Mrozek-Wilczkiewicz, K. Malarz, M. Rams-Baron et al. // *Journal of Cancer*. – 2017. – T. 8. – № 11. – P. 1979-1987.
42. Denoyer, D. Targeting copper in cancer therapy: ‘Copper That Cancer’ / D. Denoyer, S. Masaldan, S. La Fontaine, M. A. Cater // *Metallomics*. – 2015. – Vol. 7. – № 11. – P. 1459-1476.
43. Hodges, Y. K. Effect on ribonucleotide reductase of novel lipophilic iron chelators: the desferri-exochelins / Y. K. Hodges, W. E. Antholine, L. D. Horwitz // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2004. – Vol. 315. – № 3. – P. 595-598.
44. Johnson, D. K. Cytotoxic Chelators and Chelates 1. Inhibition of DNA Synthesis in Cultured Rodent and Human Cells by Aroylhydrazones and by a Copper(II) Complex of Salicylaldehyde Benzoyl Hydrazone / D. K. Johnson, T. B. Murphy, N. J. Rose et al. // *Inorganica Chimica Acta*. – 1982. Vol. 67. – P. 159-165.
45. Baker, E. Iron chelation by pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and analogues in hepatocytes in culture / E. Baker, M. L. Vitolo, J. Webb // *Biochemical Pharmacology*. – 1985. – Vol. 34. – № 17. – P. 3011-3017.
46. Halaby, R. Influence of lysosomal sequestration on multidrug resistance in cancer cells / R. Halaby // *Cancer Drug Resistance*. – 2019. – Vol. 2. – № 1. – P. 31-42.
47. Marquezin, C. A. The interaction of a thiosemicarbazone derived from R - (+) - limonene with lipid membranes / C. A. Marquezin, C. M. A. De Oliveira, F. Vandresen et al. // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2021. – Vol. 234. – P. 105018.

48. Merlot, A. M. Membrane Transport and Intracellular Sequestration of Novel Thiosemicarbazone Chelators for the Treatment of Cancer / A. M. Merlot, N. Pantarat, D. B. Lovejoy et al. // *Molecular Pharmacology*. – 2010. – Vol. 78. – № 4. – P. 675-684.
49. Appelqvist, H. Attenuation of the Lysosomal Death Pathway by Lysosomal Cholesterol Accumulation / H. Appelqvist, C. Nilsson, B. Garner et al. // *The American Journal of Pathology*. – 2011. – Vol. 178. – № 2. – P. 629-639.
50. Gutierrez, E. M. Lysosomal membrane stability plays a major role in the cytotoxic activity of the anti-proliferative agent, di-2-pyridylketone 4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT) / E. M. Gutierrez, N. A. Seebacher, L. Arzuman et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2016. – Vol. 1863. – № 7. – P. 1665-1681.
51. Lobana, T. S. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals—An overview / T. S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, S. Khanna // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2009. – Vol. 253. – № 7-8. – P. 977-1055.
52. Perillo, B. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon / B. Perillo, M. Di Donato, A. Pezone et al. // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2020. – T. 52. – № 2. – P. 192-203.
53. Phaniendra, A. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases / A. Phaniendra, D. B. Jestadi, L. Periyasamy // *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB*. – 2015. – T. 30. – № 1. – P. 11-26.
54. Narayanankutty, A. Glutathione, an Antioxidant Tripeptide: Dual Roles in Carcinogenesis and Chemoprevention / A. Narayanankutty, J. T. Job, V. Narayanankutty // *Current Protein & Peptide Science*. – 2019. – T. 20. – № 9. – P. 907-917.
55. Kennedy, L. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies / L. Kennedy, J. K. Sandhu, M.-E. Harper, M. Cuperlovic-Culf // *Biomolecules*. – 2020. – T. 10. – № 10. – P. 1429.
56. Gęgotek, A. Antioxidative and Anti-Inflammatory Activity of Ascorbic Acid / A. Gęgotek, E. Skrzydlewska // *Antioxidants*. – 2022. – T. 11. – № 10. – P. 1993.
57. Berretta, M. Multiple Effects of Ascorbic Acid against Chronic Diseases: Updated Evidence from Preclinical and Clinical Studies / M. Berretta, V. Quagliariello, N. Maurea et al. // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9. – № 12. – P. 1182.
58. Janků, M. On the Origin and Fate of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Compartments / M. Janků, L. Luhová, M. Petřivalský // *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. – 2019. – T. 8. – № 4. – P. 105.
59. Arfin, S. Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism / S. Arfin, N. K. Jha, S. K. Jha et al. // *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. – 2021. – T. 10. – № 5. – P. 642.
60. Guo, J. Ferroptosis: A Novel Anti-tumor Action for Cisplatin / J. Guo, B. Xu, Q. Han et al. // *Cancer Research and Treatment*. – 2018. – T. 50. – № 2. – P. 445-460.
61. Jurkiewicz, P. Biophysics of lipid bilayers containing oxidatively modified phospholipids: insights from fluorescence and EPR experiments and from MD

- simulations / P. Jurkiewicz, A. Olżyńska, L. Cwiklik et al. // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2012. – T. 1818. – № 10. – P. 2388-2402.
62. Smith, A. W. Lipid–protein interactions in biological membranes: A dynamic perspective : Membrane protein structure and function / A. W. Smith // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2012. – T. 1818. – № 2. – P. 172-177.
63. Clemente, S. M. Targeting Lipid Peroxidation for Cancer Treatment / S. M. Clemente, O. H. Martínez-Costa, M. Monsalve, A. K. Samhan-Arias // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 21. – P. 5144.
64. Tian, B. Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA / B. Tian, Y. Hua // *Food Chemistry*. – 2005. – T. 91. – № 3. – P. 413-418.
65. Brown, R. A. M. Altered Iron Metabolism and Impact in Cancer Biology, Metastasis, and Immunology / R. A. M. Brown, K. L. Richardson, T. D. Kabir et al. // *Frontiers in Oncology*. – 2020. – T. 10. – P. 476.
66. Salgado, P. FENTON REACTION DRIVEN BY IRON LIGANDS / P. Salgado, V. Melin, D. Contreras et al. // *Journal of the Chilean Chemical Society*. – 2013. – Vol. 58. – № 4. – P. 2096-2101.
67. Wondrak, G. T. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities / G. T. Wondrak // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2009. – T. 11. – № 12. – P. 3013-3069.
68. Chaiswing, L. Redox Paradox: A Novel Approach to Therapeutics-Resistant Cancer / L. Chaiswing, W. H. St Clair, D. K. St Clair // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2018. – T. 29. – № 13. – P. 1237-1272.
69. Graf, N. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery / N. Graf, S. J. Lippard // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2012. – T. 64. – № 11. – P. 993-1004.
70. Huang, H.-Y. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial / H.-Y. Huang, L. J. Appel, K. D. Croft et al. // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2002. – T. 76. – № 3. – P. 549-555.
71. Timoshnikov, V.A. Redox Interactions of Vitamin C and Iron: Inhibition of the Pro-Oxidant Activity by Deferiprone / V. A. Timoshnikov, T. V. Kobzeva, N. E. Polyakov, G. J. Kontoghiorghes // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – T. 21. – № 11. – P. 3967.
72. Kontoghiorghes, C. N. Phytochelators Intended for Clinical Use in Iron Overload, Other Diseases of Iron Imbalance and Free Radical Pathology / C. N. Kontoghiorghes, A. Kolnagou, G. J. Kontoghiorghes // *Molecules (Basel, Switzerland)*. – 2015. – T. 20. – № 11. – P. 20841-20872.
73. Das, K. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants / K. Das, A. Roychoudhury // *Frontiers in Environmental Science*. – 2014. – Vol. 2. – № 53.

74. Savini, I. SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake / I. Savini, A. Rossi, C. Pierro et al. // *Amino Acids*. – 2008. – Vol. 34. – SVCT1 and SVCT2. – № 3. – P. 347-355.
75. Moroi, Y. Micelles : theoretical and applied aspects. Micelles / Y. Moroi. – New York : Plenum Press, 1992. – P. 274.
76. Wong, Tuck C. Micelles and Bicelles as Membrane Mimics for Nuclear Magnetic Resonance Studies of Peptides and Proteins / Tuck C Wong. – 2013.
77. Hanafy, N. A. N. Micelles Structure Development as a Strategy to Improve Smart Cancer Therapy / N. A. N. Hanafy, M. El-Kemary, S. Leporatti // *Cancers*. – 2018. – Vol. 10. – № 7. – P. 238.
78. Tang, K. S. Protective effect of arachidonic acid and linoleic acid on 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity in PC12 cells / K. S. Tang // *Lipids in Health and Disease*. – 2014. – Vol. 13. – P. 197.
79. Shin, S. Lipid Membrane Remodeling by the Micellar Aggregation of Long-Chain Unsaturated Fatty Acids for Sustainable Antimicrobial Strategies / S. Shin, H. Tae, S. Park, N.-J. Cho // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 11. – P. 9639.
80. Björnerås, J. Analysing DHPC/DMPC bicelles by diffusion NMR and multivariate decomposition / J. Björnerås, M. Nilsson, L. Mäler // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2015. – T. 1848. – № 11, Part A. – P. 2910-2917.
81. Beaugrand, M. Lipid concentration and molar ratio boundaries for the use of isotropic bicelles / M. Beaugrand, A. A. Arnold, J. Hénin et al // *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. – 2014. – T. 30. – № 21. – P. 6162-6170.
82. Kumar, A. In-Cell NMR: Analysis of Protein-Small Molecule Interactions, Metabolic Processes, and Protein Phosphorylation / A. Kumar, L. T. Kuhn, J. Balbach // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – T. 20. – № 2. – P. 378.
83. Lee, D. Bilayer in small bicelles revealed by lipid-protein interactions using NMR spectroscopy / D. Lee, K. F. A. Walter, A.-K. Brückner et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – T. 130. – № 42. – P. 13822-13823.
84. Kashnik, A.S. Localization of the ibuprofen molecule in model lipid membranes revealed by spin-label-enhanced NMR relaxation / A. S. Kashnik, O. Yu. Selyutina, D. S. Baranov et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2023. – T. 1865. – № 8. – P. 184215.
85. Noguchi, H. Structure formation in binary mixtures of surfactants: vesicle opening-up to bicelles and octopus-like micelles / H. Noguchi // *Soft Matter*. – 2012. – T. 8. – № 34. – P. 8926.
86. Bangham, A. D. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope / A. D. Bangham, R. W. Horne // *Journal of Molecular Biology*. – 1964. – T. 8. – № 5. – P. 660-IN10.

87. Sharma, A. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations / A. Sharma, U. S. Sharma // *International Journal of Pharmaceutics*. – 1997. – T. 154. – № 2. – P. 123-140.
88. Magin, R. L. Liposome delivery of NMR contrast agents for improved tissue imaging / R. L. Magin, S. M. Wright, M. R. Niesman et al. // *Magnetic Resonance in Medicine*. – 1986. – Vol. 3. – № 3. – P. 440-447.
89. Devoisselle, J. M. Entrapment of gadolinium-DTPA in liposomes. Characterization of vesicles by P-31 NMR spectroscopy / J. M. Devoisselle, J. Vion-Dury, J. P. Galons et al. // *Investigative Radiology*. – 1988. – T. 23. – № 10. – P. 719-724.
90. Unger, E. Liposomes as MR contrast agents: pros and cons / E. Unger, D. K. Shen, G. L. Wu, T. Fritz // *Magnetic Resonance in Medicine*. – 1991. – T. 22. – № 2. – P. 304-308.
91. Bayburt, T. H. Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins / T. H. Bayburt, Y. V. Grinkova, S. G. Sligar // *Nano Letters*. – 2002. – T. 2. – № 8. – P. 853-856.
92. Denisov, I. G. Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size / I. G. Denisov, Y. V. Grinkova, A. A. Lazarides, S. G. Sligar // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – T. 126. – № 11. – P. 3477-3487.
93. Denisov, I. G. Nanodiscs for structural studies of membrane proteins / I. G. Denisov, S. G. Sligar // *Nature structural & molecular biology*. – 2016. – T. 23. – № 6. – P. 481-486.
94. Ren, Q. Circularized fluorescent nanodiscs for probing protein-lipid interactions / Q. Ren, S. Zhang, H. Bao // *Communications Biology*. – 2022. – T. 5. – № 1. – P. 507.
95. Zhang, G. Identifying Membrane Protein–Lipid Interactions with Lipidomic Lipid Exchange–Mass Spectrometry / G. Zhang, M. T. Odenkirk, C. M. Janczak et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2023. – T. 145. – № 38. – P. 20859-20867.
96. Dalal, V. Lipid nanodisc scaffold and size alter the structure of a pentameric ligand-gated ion channel / V. Dalal, M. J. Arcario, J. T. Petroff et al. // *Nature Communications*. – 2024. – T. 15. – № 1. – P. 25.
97. Dolan, K. A. Structure of SARS-CoV-2 M protein in lipid nanodiscs / K. A. Dolan, M. Dutta, D. M. Kern et al. // *eLife*. – T. 11. – P. e81702.
98. Bayburt, T. H. Assembly of single bacteriorhodopsin trimers in bilayer nanodiscs / T. H. Bayburt, Y. V. Grinkova, S. G. Sligar // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2006. – T. 450. – № 2. – P. 215-222.
99. Рубин, А. Б. Биофизика, том 2 / А. Б. Рубин. – Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 2004. – 469 с.

100. Антонов, В.Ф., Черныш, А. М. и др., Биофизика, Учебник для студентов высших учебных заведений / В.Ф. Антонов. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: Владос, 2003. – 288 с.
101. Chatterjee, S. N. Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation / S. N. Chatterjee, S. Agarwal // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1988. – Vol. 4. – № 1. – P. 51-72.
102. Haase, G. Ascorbic acid and copper in linoleate oxidation. I. Measurement of oxidation by ultraviolet spectrophotometry and the thiobarbituric acid test / G. Haase, W. L. Dunkley // *Journal of Lipid Research*. – 1969. – T. 10. – № 5. – P. 555-560.
103. Bakır, T. Quantification of Antioxidant Ability Against Lipid Peroxidation with an 'Area Under Curve' Approach / T. Bakır, İ. Sönmezoglu, R. Apak // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 2017. – Vol. 94. – № 1. – P. 77-88.
104. Esterbauer, H. Estimation of peroxidative damage. A critical review / H. Esterbauer // *Pathologie-Biologie*. – 1996. – T. 44. – № 1. – P. 25-28.
105. Halliwell, B. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance / B. Halliwell, S. Chirico // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 1993. – T. 57. – № 5 Suppl. – P. 715S-724S.
106. Pinchuk, I. Analysis of the kinetics of lipid peroxidation in terms of characteristic time-points / I. Pinchuk, D. Lichtenberg // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2014. – T. 178. – P. 63-76.
107. Yahyavi, H. A rapid spectrofluorimetric method for the determination of malondialdehyde in human plasma after its derivatization with thiobarbituric acid and vortex assisted liquid–liquid microextraction / H. Yahyavi, M. Kaykhaii, M. Hashemi // *RSC Advances*. – 2016. – Vol. 6. – № 3. – P. 2361-2367.
108. Xun, S. Chemiluminescence study on the peroxidation of linoleic acid initiated by the reaction of ferrous iron with hydrogen peroxide / S. Xun, T. Jingdong, Z. Zhaonan, L. Xinyuan // *Biophysical Chemistry*. – 1991. – T. 40. – № 2. – P. 161-167.
109. Sharov, V. S. Selective sensitization of chemiluminescence resulted from lipid and oxygen radical reactions / V. S. Sharov, V. A. Kazamanov, Y. A. Vladimirov // *Free Radical Biology & Medicine*. – 1989. – T. 7. – № 3. – P. 237-242.
110. Stott, K. Excitation Sculpting in High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Application to Selective NOE Experiments / K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1995. – Vol. 117. – № 14. – P. 4199-4200.
111. Mamardashvili, G. M. Supramolecular assembly of hydrophilic Co(III)-porphyrin with bidentate ligands in aqueous buffer media / G. M. Mamardashvili, E. Yu. Kaigorodova, I. S. Lebedev et al. // *Inorganica Chimica Acta*. – 2022. – T. 538. – P. 120972.
112. Scheidt, H. A. The interaction of small molecules with phospholipid membranes studied by ¹H NOESY NMR under magic-angle spinning / H. A. Scheidt, D. Huster // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2008. – Vol. 29. – № 1. – P. 35-49.

113. Stroet, M. Automated Topology Builder Version 3.0: Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane / M. Stroet, B. Caron, K. M. Visscher et al. // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2018. – Vol. 14. – № 11. – P. 5834-5845.
114. Poger, D. On the Validation of Molecular Dynamics Simulations of Saturated and *cis* -Monounsaturated Phosphatidylcholine Lipid Bilayers: A Comparison with Experiment / D. Poger, A. E. Mark // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2010. – Vol. 6. – № 1. – P. 325-336.
115. Parrinello, M. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method / M. Parrinello, A. Rahman // Journal of Applied Physics. – 1981. – Vol. 52. – № 12. – P. 7182-7190.
116. Hoover, W. G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions / W. G. Hoover // Physical Review A. – 1985. – Vol. 31. – № 3. – P. 1695-1697.
117. Essmann, U. A smooth particle mesh Ewald method / U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz et al. // The Journal of Chemical Physics. – 1995. – Vol. 103. – № 19. – P. 8577-8593.
118. Kaya, B. Innovative N-Acridine Thiosemicarbazones and Their Zn(II) Complexes Transmetallate with Cu(II): Redox Activity and Suppression of Detrimental Oxy-Myoglobin Oxidation / B. Kaya, H. Smith, Y. Chen et al. // Inorganic Chemistry. – 2024. – T. 63. – № 43. – P. 20840-20858.
119. Da Cunha, A. R. Experimental and theoretical studies of emodin interacting with a lipid bilayer of DMPC / A. R. Da Cunha, E. L. Duarte, H. Stassen et al. // Biophysical Reviews. – 2017. – Vol. 9. – № 5. – P. 729-745.
120. Pinkwart, K. Nanoscale dynamics of cholesterol in the cell membrane / K. Pinkwart, F. Schneider, M. Lukoseviciute et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2019. – Vol. 294. – № 34. – P. 12599-12609.
121. Richardson, D. R. Iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class Part I. Ionisation characteristics of the ligands and their relevance to biological properties / D. R. Richardson, L. M. Wis Vitolo, G. T. Hefter et al. // Inorganica Chimica Acta. – 1990. – T. 170. – № 2. – P. 165-170.
122. Richardson, D. R. The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents / D. R. Richardson, E. H. Tran, P. Ponka // Blood. – 1995. – Vol. 86. – № 11. – P. 4295-4306.
123. Yuan, J. Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment / J. Yuan, D. B. Lovejoy, D. R. Richardson // Blood. – 2004. – Vol. 104. – № 5. – P. 1450-1458.
124. Stefani, C. Alkyl Substituted 2'-Benzoylpyridine Thiosemicarbazone Chelators with Potent and Selective Anti-Neoplastic Activity: Novel Ligands that Limit Methemoglobin Formation / C. Stefani, P. J. Jansson, E. Gutierrez et al. // Journal of Medicinal Chemistry. – 2013. – T. 56. – № 1. – P. 357-370.
125. Stefani, C. Halogenated 2'-Benzoylpyridine Thiosemicarbazone (XBpT) Chelators with Potent and Selective Anti-Neoplastic Activity: Relationship to

Intracellular Redox Activity / C. Stefani, G. Punnia-Moorthy, D. B. Lovejoy et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2011. – T. 54. – № 19. – P. 6936-6948.

126. Orsi, M. Permeability of drugs and hormones through a lipid bilayer: insights from dual-resolution molecular dynamics / M. Orsi, J. W. Essex // *Soft Matter*. – 2010. – Vol. 6. – № 16. – P. 3797-3808.

127. Boggara, M. B. Partitioning of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Lipid Membranes: A Molecular Dynamics Simulation Study / M. B. Boggara, R. Krishnamoorti // *Biophysical Journal*. – 2010. – T. 98. – № 4. – P. 586-595.

128. Khajeh, A. The influence of cholesterol on interactions and dynamics of ibuprofen in a lipid bilayer / A. Khajeh, H. Modarress // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2014. – T. 1838. – № 10. – P. 2431-2438.

129. Fouchier, F. Thyroid lysosomes: the stability of the lysosomal membrane / F. Fouchier, J. L. Mego, J. Dang, C. Simon // *European Journal of Cell Biology*. – 1983. – T. 30. – № 2. – P. 272-278.

130. Auger, M. Interactions of the local anesthetic tetracaine with membranes containing phosphatidylcholine and cholesterol: a deuterium NMR study / M. Auger, H. C. Jarrell, I. C. P. Smith // *Biochemistry*. – 1988. – T. 27. – № 13. – P. 4660-4667.

131. Abe, F. Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae* / F. Abe, T. Hiraki // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2009. – T. 1788. – № 3. – P. 743-752.

132. Sutter, M. Correlation of membrane order and dynamics derived from time-resolved fluorescence measurements with solute permeability / M. Sutter, T. Fiechter, G. Imanidis // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2004. – T. 93. – № 8. – P. 2090-2107.

133. Selyutina, O. Yu. Ascorbate-and iron-driven redox activity of Dp44mT and Emodin facilitates peroxidation of micelles and bicelles / O. Yu. Selyutina, P. A. Kononova, V. E. Koshman et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2022. – Vol. 1866. – № 4. – P. 130078.

134. Whitnall, M. A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics / M. Whitnall, J. Howard, P. Ponka, D. R. Richardson // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103. – № 40. – P. 14901-14906.

135. Kovacevic, Z. Novel Thiosemicarbazone Iron Chelators Induce Up-Regulation and Phosphorylation of the Metastasis Suppressor N-myc Down-Stream Regulated Gene 1: A New Strategy for the Treatment of Pancreatic Cancer / Z. Kovacevic, S. Chikhani, D. B. Lovejoy, D. R. Richardson // *Molecular Pharmacology*. – 2011. – Vol. 80. – № 4. – P. 598-609.

136. Yu, Y. Bp44mT: an orally active iron chelator of the thiosemicarbazone class with potent anti-tumour efficacy / Y. Yu, Y. S. Rahmanto, D. Richardson // *British Journal of Pharmacology*. – 2012. – Vol. 165. – № 1. – P. 148-166.

137. Koshman, V.E. Interaction of novel N-acridine thiosemicarbazones with lipid membrane: NMR and molecular dynamics simulations / V. E. Koshman,

A. A. Dmitriev, V. A. Timoshnikov et al. // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2025. – T. 768. – P. 110390.

138. Richardson, D. R. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells / D. R. Richardson, P. Ponka // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes. – 1997. – Vol. 1331. – № 1. – P. 1-40.

139. Des, R. R. Does free extracellular iron exist in haemochromatosis and other pathologies, and is it redox active? / R. R. Des, R. T. Dean // Clinical Science. – 2001. – Vol. 100. – № 3. – P. 237-238.

140. Wong-ekkabut, J. Effect of Lipid Peroxidation on the Properties of Lipid Bilayers: A Molecular Dynamics Study / J. Wong-ekkabut, Z. Xu, W. Triampo et al. // Biophysical Journal. – 2007. – Vol. 93. – № 12. – P. 4225-4236.

141. der Paal, J. V. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress / J. V. der Paal, E. C. Neyts, C. C. W. Verlackt, A. Bogaerts // Chemical Science. – 2015. – Vol. 7. – № 1. – P. 489-498.

142. Hayes, J. D. Oxidative Stress in Cancer / J. D. Hayes, A. T. Dinkova-Kostova, K. D. Tew // Cancer Cell. – 2020. – Vol. 38. – № 2. – P. 167-197.

143. Kalinowski, D. S. Future of Toxicology Iron Chelators and Differing Modes of Action and Toxicity: The Changing Face of Iron Chelation Therapy / D. S. Kalinowski, D. R. Richardson // Chemical Research in Toxicology. – 2007. – Vol. 20. – № 5. – P. 715-720.

144. Wijesinghe, T. P. Innovative therapies for neuroblastoma: The surprisingly potent role of iron chelation in up-regulating metastasis and tumor suppressors and down-regulating the key oncogene, N-myc / T. P. Wijesinghe, M. Dharmasivam, C. C. Dai, D. R. Richardson // Pharmacological Research. – 2021. – T. 173. – P. 105889.

145. Barrera, G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy / G. Barrera // ISRN Oncology. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1-21.

146. Dix, T. A. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation / T. A. Dix, J. Aikens // Chemical Research in Toxicology. – 1993. – Vol. 6. – № 1. – P. 2-18.

147. Cheng, Z. What Is Responsible for the Initiating Chemistry of Iron-Mediated Lipid Peroxidation: An Update / Z. Cheng, Y. Li // Chemical Reviews. – 2007. – Vol. 107. – № 3. – P. 748-766.

148. Mihaljević, B. Linoleic acid peroxidation vs. isomerization: a biomimetic model of free radical reactivity in the presence of thiols / B. Mihaljević, I. Tartaro, C. Ferreri, C. Chatgililoglu // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2011. – Vol. 9. – № 9. – P. 3541-3548.

149. Laguerre, M. Toward a Spatiotemporal Model of Oxidation in Lipid Dispersions: A Hypothesis-Driven Review / M. Laguerre, M. Tenon, A. Bily, S. Birtić

// European Journal of Lipid Science and Technology. – 2020. – Vol. 122. – № 3. – P. 1900209.

150. Perez-Benito, J. F. Iron(III)–Hydrogen Peroxide Reaction: Kinetic Evidence of a Hydroxyl-Mediated Chain Mechanism / J. F. Perez-Benito // The Journal of Physical Chemistry A. – 2004. – Vol. 108. – № 22. – P. 4853-4858.

151. Barbusinski, K. Fenton reaction - Controversy concerning the chemistry / K. Barbusinski // Ecological Chemistry and Engineering S. – 2009. – T. 16. – P. 347-358.

152. Hasinoff, B. B. The iron chelator Dp44mT does not protect myocytes against doxorubicin / B. B. Hasinoff, D. Patel // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2009. – T. 103. – № 7. – P. 1093-1101.

153. González, M. A. Proton-assisted air oxidation mechanisms of iron(II) bis-thiosemicarbazone complexes at physiological pH: a kinetic-mechanistic study / M. A. González, A. G. Algarra, M. G. Basallote et al. // Dalton Transactions. – 2019. – Vol. 48. – № 44. – P. 16578-16587.

154. Tóth, M. Chemical stabilization of tetrahydrobiopterin by L-ascorbic acid: contribution to placental endothelial nitric oxide synthase activity / M. Tóth, Z. Kukor, S. Valent // Molecular Human Reproduction. – 2002. – T. 8. – № 3. – P. 271-280.