

Лукина Мария Максимовна

**Флуоресцентная микроскопия с временным разрешением в изучении метаболизма
опухолевых клеток при химиотерапии**

03.01.02 — биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2019

Работа выполнена на кафедре биофизики Института биологии и биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» и на базе научной лаборатории флюоресцентного биоимиджинга научно-исследовательского института экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:	Ширманова Марина Вадимовна кандидат биологических наук заместитель директора по науке и заведующий научной лабораторией флюоресцентного биоимиджинга НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Официальные оппоненты:	Феофанов Алексей Валерьевич доктор биологических наук, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» Кантидзе Омар Леванович доктор биологических наук, заведующий лабораторией стабильности генома ФГБУН «Институт биологии гена Российской академии наук»
Ведущая организация:	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «23» апреля 2020 года в 15:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.21 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д 23, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/files/2019/1006/diss-Lukina-1006.pdf>

Автореферат разослан « » 2020 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Соколова Евгения Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Известно, что энергетический метаболизм многих опухолевых клеток характеризуется высокой интенсивностью гликолиза даже в присутствии кислорода, что связано с их активным ростом и пролиферацией (*Lopez-Lazaro, 2008; Warburg et al., 1927; Pelicano et al., 2006*). Также, гликолиз способствует снижению образования свободных радикалов, что минимизирует вероятность генотоксических повреждений в клетке и способствует уходу от апоптоза (*Cairns 2011*). В отличие от опухолевых клеток, в нормальных клетках основным источником АТФ является окислительное фосфорилирование.

В роли переносчиков электронов и протонов в реакциях энергетического метаболизма клетки выступают кофакторы НАД/НАДН (никотинамидадениндинуклеотид) и ФАД/ФАДН₂ (флавинадениндинуклеотид). Восстановленный НАДН и его фосфорилированная форма НАДФН (суммарно обозначаемые НАД(Ф)Н) и окисленная форма ФАД способны к автофлуоресценции (*Chorvat, and Chorvatova 2008*). На регистрации флуоресценции метаболических кофакторов основан оптический метаболический имиджинг, который включает в себя анализ отношения интенсивностей флуоресценции (редокс-отношение) и время-разрешенный флуоресцентный имиджинг (FLIM) (*Chance, et al., 1979; Lakowicz, et al., 1992; Щеславский и др., 2019*). Редокс - отношение дает информацию об общей метаболической активности клетки. Тогда как с помощью FLIM можно анализировать времена жизни флуоресценции НАД(Ф)Н. Кофактор НАД(Ф)Н находится в клетке в свободном и связанном с белками состояниях, которые практически идентичны по спектральным характеристикам, но значительно отличаются по времени жизни флуоресценции. (*Chance, et al., 1979; Lakowicz, et al., 1992; Щеславский и др., 2019*). Таким образом, FLIM дает возможность различать свободные и связанные формы НАД(Ф)Н в живых клетках и тканях в режиме реального времени. Короткое время жизни флуоресценции НАД(Ф)Н (t_1) соответствуют его свободной (не связанной с белком) форме, длинное время жизни флуоресценции (t_2) – связанной с белками форме. В свободной форме НАДН локализуется, преимущественно, в цитоплазме и участвует в реакциях гликолиза, тогда как в связанной с белками форме локализуется на мембране митохондрии и участвует в окислительном фосфорилировании (*Skala, et al., 2007; Ruck et al., 2014*). НАДФН напрямую в реакциях энергетического метаболизма не участвует, однако, играет роль в синтетических реакциях (производство жирных кислот, стероидов и каротиноиды), регулировании клеточных сигналов и антиоксидантных системах. НАДФН обладает более длинными временами жизни флуоресценции (4.4 нс) и концентрация его в опухолевых клетках крайне мала (*Blacker, 2014*).

Традиционные методы анализа энергетического метаболизма, такие как позитронно-эмиссионная томография с ¹⁸F-фтордезоксиглюкозой, масс-спектрометрия и биохимические исследования. имеют ряд недостатков. В частности, требуют введения контрастирующего агента,

реализуются на дорогостоящем оборудовании, имеют сложные протоколы приготовления препаратов. Перспективным методом в области исследования энергетического обмена является флуоресцентный время-разрешенный имиджинг кофактора НАДН. Бесспорными преимуществами данного метода являются неинвазивность, высокая чувствительность, биологическая безопасность, отсутствие необходимости в применении экзогенных красителей. Метод дает уникальную возможность анализировать метаболические особенности опухолевых клеток без дополнительной подготовки, вмешательств и окрашивания. Флуоресцентный время-разрешенный имиджинг НАД(Ф)Н является новым методом и на сегодняшний день реализован, в основном, на монослойных культурах *in vitro* для задач поиска отличий между опухолевыми и нормальными клетками (Yu and Heikal, 2009; Ramanujan et al., 2005; Ruck et al., 2014) и оценки ответа клеток на лечение (Shah et al., 2014; Drozdowicz-Tomsia et al. 2014). Исследования энергетического метаболизма при канцерогенезе *in vivo* ограничены единичными работами (Skala, et al., 2007). В связи с этим, актуальной задачей является разработка методических подходов к оценке метаболизма в сложных и классических опухолевых моделях и оценка возможностей флуоресцентного время-разрешенного имиджинга для мониторинга эффективности противоопухолевой химиотерапии.

Цели и задачи работы

Цель настоящей работы заключалась в разработке методики оценки метаболического статуса на основе флуоресцентной время-разрешенной микроскопии (FLIM) в различных опухолевых моделях и выявлении характерных изменений параметров флуоресценции метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД при химиотерапии препаратами с различными механизмами действия.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать методики оценки метаболического статуса живых опухолевых клеток на основе флуоресцентной время-разрешенной микроскопии эндогенных кофакторов для моделей с различной организацией: монослойных клеточных культур, сфероидов и подкожных опухолей экспериментальных животных.
2. Методом флуоресцентной время-разрешенной микроскопии исследовать изменения параметров флуоресценции метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в процессе химиотерапии в монослойных клеточных культурах.
3. Методом флуоресцентной время-разрешенной микроскопии исследовать изменения параметров флуоресценции метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в процессе химиотерапии в опухолевых сфероидах.
4. Оценить влияние химиопрепаратов с различным механизмом действия на параметры флуоресценции метаболического кофактора НАД(Ф)Н опухолевых клеток на основе флуоресцентной время-разрешенной микроскопии в опухолях мышей *in vivo*.

Научная новизна

1. Разработаны оригинальные методики оценки метаболического статуса живых опухолевых клеток на основе флуоресцентной время-разрешенной микроскопии эндогенных кофакторов для моделей с различной организацией: монослойных клеточных культур, сфероидов и подкожных опухолей экспериментальных животных.

2. Методом флуоресцентной время-разрешенной микроскопии эндогенных кофакторов впервые проведен мониторинг изменения метаболического статуса живых опухолевых клеток при химиотерапии в монослойных клеточных культурах в динамике в индивидуальных клетках. Выявлены клеточные субпопуляции с различной чувствительностью к химиотерапии и динамикой изменения флуоресцентных параметров метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД.

3. Методом флуоресцентной время-разрешенной микроскопии эндогенных кофакторов впервые продемонстрирована метаболическая гетерогенность на опухолевых сфероидов, ассоциированная с различной пролиферативной активностью клеток. Выявлены изменения флуоресцентных параметров метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в живых клетках опухолевого сфероида при химиотерапии.

4. Впервые исследованы изменения флуоресцентных параметров метаболического кофактора НАД(Ф)Н на мышинных опухолевых моделях. Показана возможность прижизненной визуализации метаболического статуса на клеточном уровне метаболизма опухолей животных *in vivo* при химиотерапии препаратами с различными механизмами действия.

Научно-практическая значимость

В работе показана возможность прижизненного неинвазивного исследования опухолевого метаболизма на всех уровнях организации: монослойных клеточных культурах, сфероидов, опухолях животных *in vivo*. Разработаны универсальные методики по изучению опухолевого метаболизма в живых объектах на основе флуоресцентной время-разрешенной микроскопии эндогенных кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД и проведено комплексное исследование изменений энергетического метаболизма для опухолевых моделей с различной организацией под действием химиотерапии. С помощью разработанных методик были установлены однонаправленные изменения метаболических параметров *in vitro* и *in vivo* в ответ на химиотерапию препаратами с различным механизмом действия.

Результаты диссертационного исследования представляют фундаментальное значение для уточнения механизмов опухолевой прогрессии, ответа опухоли на лечение и опухолевой резистентности. Поскольку метод FLIM основан на регистрации эндогенной флуоресценции, а значит, не требует дополнительного окрашивания клеток и тканей, полученные результаты указывают на потенциальные приложения в клинике для задач опухолевой диагностики, анализа

раннего ответа опухоли на лечение, доклинических испытаний новых противоопухолевых агентов, индивидуального подбора терапии.

Основные результаты работы могут быть включены в соответствующие разделы спецкурсов и лекций общего курса по биофизике, биохимии, биомедицине и физиологии человека и животных.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанные методики на основе флуоресцентной время-разрешенной микроскопии эндогенных кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД дают возможность анализировать метаболический статус живых опухолевых клеток в моделях с различной организацией: монослойных клеточных культурах, сфероидов и подкожных опухолях мышей.

2. При химиотерапии препаратами с различным механизмом действия происходит увеличение редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н и снижение вклада свободного НАД(Ф)Н в опухолевых клетках *in vitro* и *in vivo*.

3. На монослойной клеточной культуре при химиотерапии паклитакселом в погибающих клетках изменения в виде увеличения редокс-отношения и снижения вклада свободного НАД(Ф)Н происходят раньше, чем в выживающих клетках со сниженной пролиферацией.

4. Активно пролиферирующие клетки наружного слоя сфероида имеют более высокие значения вклада свободного НАД(Ф)Н по сравнению с клетками внутренней зоны. При химиотерапии цисплатином и паклитакселом увеличивается редокс-отношение ФАД/НАД(Ф)Н и снижается вклад свободного НАД(Ф)Н в клетках наружного слоя сфероида.

5. Метаболические изменения в клетках опухолей животных при химиотерапии предшествуют морфологическим и ростовым проявлениям ответа опухоли на лечение.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 29 научных работ, из них 8 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в перечень ВАК, и 21 тезисы конференций.

Достоверность полученных результатов

Достоверность научных результатов и выводов, полученных в работе, обусловлена использованием широко применяемых на практике в биологии и медицине методов оптической визуализации биологических объектов. Полученные данные подтверждены общепринятыми методами и соответствуют теоретическим выводам и обоснованиям.

Апробация работы

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на II Всероссийской XIII Межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2015 г.); XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2015 г.); V Международном

симпозиуме «Актуальные проблемы биофотоники 2015» (Нижний Новгород – Елабуга – Нижний Новгород, 2015 г.); SPIE Photonics Europe (Бельгия, 2016 г.); I Международной школе ADFLIM (Москва, 2016 г.); SPIE Photonics West, BIOS (Сан-Франциско, 2017 г.); III Всероссийской XIV Межрегиональной с международным участием Научной сессии молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем медицины» (Нижний Новгород, 2017 г.); 70-я Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых учёных «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2017); 12-ом Международном Workshop on Advanced Multiphoton and Fluorescence Lifetime Imaging Techniques FLIM (Германия, 2017 г.); VI Международном симпозиуме «Актуальные проблемы биофотоники 2017» (Санкт-Петербург – Нижний Новгород, 2017 г.); 71-ой Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», (Нижний Новгород, 2018 г); 72-ой Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», (Нижний Новгород, 2019 г); VII Международном симпозиуме «Актуальные проблемы биофотоники 2019» (Нижний Новгород – Углич – Нижний Новгород, 2019 г.); VI Съезде биофизиков России (Сочи, 2019 г.).

Структура и объем диссертации.

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 107 страницах, содержит 13 рисунков и 8 таблиц. Список литературы содержит 163 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **главе 1** представлен обзор литературы, посвященный следующим основным темам:

ко-факторы НАД(Ф)Н и ФАД и их вклад в энергетический метаболизм клетки, понятия и общие принципы оптического метаболического имиджинга, особенности энергетического метаболизма опухоли, критерии ответа опухоли на лечение.

В **главе 2** перечислены использованные в работе объекты исследований, реактивы и оборудование, описаны методики исследований.

Клеточные культуры. В работе были использованы 2 линии библиотечных опухолевых клеток: рак шейки матки человека (HeLa Kyoto) и колоректальный рак мыши (CT26);

Модель опухолевого сфероиды. Работа проводилась на опухолевых клетках линии HeLa Kyoto в условиях 3D культивирования.

Лабораторные животные. Эксперименты выполнены на иммунодефицитных мышах-самках линии nu/nu, и мышах-самках линии Balb/C. Общее количество животных - 70.

Опухолевые модели. В работе использовались прививные опухолевые модели:

- 2 млн опухолевых клеток HeLa Kyoto, суспендированных в 200 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS), вводили подкожно на левое бедро мышей линии nu/nu;

- 500 тыс опухолевых клеток СТ26 суспендированных в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS), вводили подкожно на левое бедро мышей линии Balb/C.

Регистрацию размеров опухолей проводили 3 раза в неделю с помощью штангенциркуля.

Культивирование опухолевых клеток

Библиотечные клеточные культуры HeLa Kyoto и СТ26 культивировали по стандартной методике в CO₂ инкубаторе при 37° С в атмосфере 5% CO₂, с использованием питательной среды ДМЕМ (Панеко, Россия) с добавлением глутамина, пенициллина и стрептомицина, а также 10% бычьей эмбриональной сывороткой (HyClone, США).

Протоколы химиотерапии

1. Протокол лечения цисплатином. Для *in vitro* исследований монослойной клеточной культуры был использован препарат цисплатин (Тева, Израиль) с концентрацией 2.6 μ M (IC35). Для экспериментов с опухолевыми сфероидом применяли концентрацию препарата 5.2 μ M (2x IC35 для монослойной клеточной культуры). Для *in vivo* экспериментов на мышах линии nu/nude с опухолями HeLa Kyoto была использована терапевтическая доза цисплатина 5 мг/кг массы тела, разведение осуществляли в 100 мкл PBS, препарат вводили внутривентально. Лечение начинали, когда опухоль достигала диаметра 0.5 см, что соответствовало ~ 6-7 дню опухолевого роста. Всего было введено 11 доз в течение 4 недель. Для *in vivo* исследований на мышах линии Balb/C с опухолями СТ26 была использована доза цисплатина 5 мг/кг массы тела в 100 мкл PBS, препарат вводили внутривентально. Лечение начинали с первого дня опухолевого роста, три раза в неделю, всего было 9 доз в течение 3 недель.

2. Протокол лечения паклитакселом. Для *in vitro* экспериментов на монослойной клеточной культуре HeLa Kyoto использовали паклитаксел (Bristol-Myers Squibb S.r.L., Италия) с концентрацией 3.2 нМ (IC50). Для исследований опухолевых сфероидов использовали концентрацию препарата 6.4 нМ (2x IC50 для монослойной клеточной культуры). Для *in vivo* экспериментов на мышах линии Balb/C с опухолями СТ26 использовали дозу паклитаксела 10 мг/кг массы тела в 20 мкл PBS и вводили внутривенно. Лечение начинали с 5 дня опухолевого роста, раз в неделю, всего 3 дозы в течение 3 недель.

3. Протокол лечения иринотеканом. Иринотекан (Fresenius Kabi GmbH, Германия) использовали только для *in vivo* экспериментов в связи с высокой флуоресценцией препарата в *in vitro* условиях. Доза препарата была 20 мг/кг массы тела в 100 мкл PBS, вводили внутривентально. Лечение начинали со 2 дня опухолевого роста, каждый день в течение пяти дней, затем, курс лечения повторяли через 7 дней после последней дозы. Всего 10 доз в течение 3 недель.

Многофотонная флуоресцентная микроскопия и FLIM

Для регистрации интенсивности и времени жизни флуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в экспериментах на монослойных клеточных культурах *in vitro* использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) с FLIM приставкой SPC

150 TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Германия) и фемтосекундным лазером Mai Tai HP (Spectra-Physics, США). Для двухфотонного возбуждения флуоресценции НАД(Ф)Н использовали длину волны 750 нм, диапазон регистрации флуоресценции 450 - 490 нм. Для двухфотонного возбуждения флуоресценции ФАД использовали длину волны 900 нм, принимали флуоресценцию в диапазоне 500 - 550 нм. Мощность возбуждающего излучения в обоих случаях составляла 6 мВт. Для оптимизации условий наблюдения, во время эксперимента клетки находились в инкубаторе XLmulti S2 DARK (PeCon GmbH, Германия) при 37° C, 5% CO₂. Все эксперименты проводились в затемненном помещении с изолированными от внешнего освещения детекторами.

Для регистрации флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н и ФАД в экспериментах на опухолевых сфероиды *in vitro* и мышинных опухолях *in vivo* использовали многофотонный флуоресцентный томограф MPTflex (JenLab, Германия) с FLIM модулем SPC 150 TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Германия). Флуоресценцию НАД(Ф)Н возбуждали на длине волны 750 нм, ФАД - 900 нм. Эмиссию регистрировали через широкополосный фильтр 409 – 660 нм, предусмотренный в системе. Мощность возбуждающего излучения составляла 10 мВт для НАД(Ф)Н и 22 мВт для ФАД. Сигнал второй гармоники от коллагена возбуждали на длине волны 750 нм и регистрировали в диапазоне 373 – 387 нм.

Анализ интенсивности флуоресценции кофакторов и расчет отношения ФАД/НАД(Ф)Н производили в программе ImageJ (National Institutes of Health, США). Количественно обсчитывали сигнал флуоресценции в области цитоплазмы. Времена жизни флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н (t_1 , t_2 , t_m) и относительные вклады короткой и длинной компонент затухания (a_1 и a_2 , соответственно, где $a_1 + a_2 = 100\%$) оценивали в программе SPCLife (Becker & Hickl GmbH, Германия). Изображение импортировали в программу, выбирали участки с допустимым хи-квадратом (от 0.8 до 1.2), выделяли область цитоплазмы клетки, исключая ядро.

Анализ пролиферативной активности клеток in vitro

Для оценки пролиферативной активности клетки высевали в 12-луночные планшеты в количестве 1×10^5 клеток в 1 мл на лунку. Через 24 ч после посева клеток к ним добавляли препарат (цисплатин или паклитаксел в зависимости от эксперимента) и инкубировали с препаратом в течение 6, 24 и 48 ч. Затем клетки суспензировали и окрашивали трипановым синим. Общее количество клеток в суспензии и количество мертвых клеток рассчитывали с использованием автоматического счетчика клеток TC20 (Bio-Rad, США). Данные были представлены как относительная пролиферация клеток (общее количество клеток, деленное на количество посеянных клеток).

Анализ жизнеспособности клеток in vitro

Для визуализации жизнеспособности клеток в монослойных клеточных культурах и опухолевых сфероиды проводили окрашивание с помощью набора с Пропидиумом иодидом (PI) и Кальцеином (Thermo Fisher Scientific, Великобритания). Визуализацию красителей

осуществляли на флуоресцентном микроскопе Leica DMIL (Leica, Германия) на увеличении 10х. Кальцеин окрашивает только живые клетки, для регистрации сигнала использовали светофильтр YFP ET (λ_{Ex} : 500/20, λ_{Em} : 535/30). Пропидиум иодид проникает в мертвые клетки, флуоресценцию детектировали при помощи светофильтра TX2 green (λ_{Ex} : 560/40, λ_{Em} : 645/75).

Патоморфологический анализ опухолей

Для микроскопического исследования материал помещался в 10% раствор нейтрального формалина на 24 ч. Фиксированные образцы обезживались по восходящей концентрации спиртов и заливались в парафин. С парафиновых блоков на роторном микротоме Leica 450RM (Leica Microsystems, Германия) изготавливались срезы толщиной 5-7 мкм. Срезы окрашивались гематоксилином и эозином по стандартному протоколу. Структуру опухоли изучали с помощью прямого светового микроскопа Leica DFC290 (Leica Microsystems, Германия) на увеличениях 10х, 20х и 40х.

Методика метаболического имиджинга НАД(Ф)Н и ФАД опухолевых сфероидов.

Опухолевые сфероиды формировали путем выращивания клеток HeLa Kyoto в условиях 3D культивирования. Клетки были посеяны на круглодонные планшеты с неадгезивным дном (Corning, Великобритания) в количестве 100 клеток на лунку. На пятый день после посадки в лунках формировались зрелые сфероиды. Для флуоресцентной визуализации сфероиды переносились из планшета на чашки для конфокальной микроскопии со стеклянным дном (Ibidi, Германия) в среде DMEM life без фенолового красного (Gibco, США) в количестве 8 штук на чашку. Регистрацию флуоресценции кофакторов проводили через 2-3 ч после посадки сфероидов на чашки, когда сфероиды прикреплялись к стеклянному дну чашки. Схема эксперимента представлена на рисунке 1.

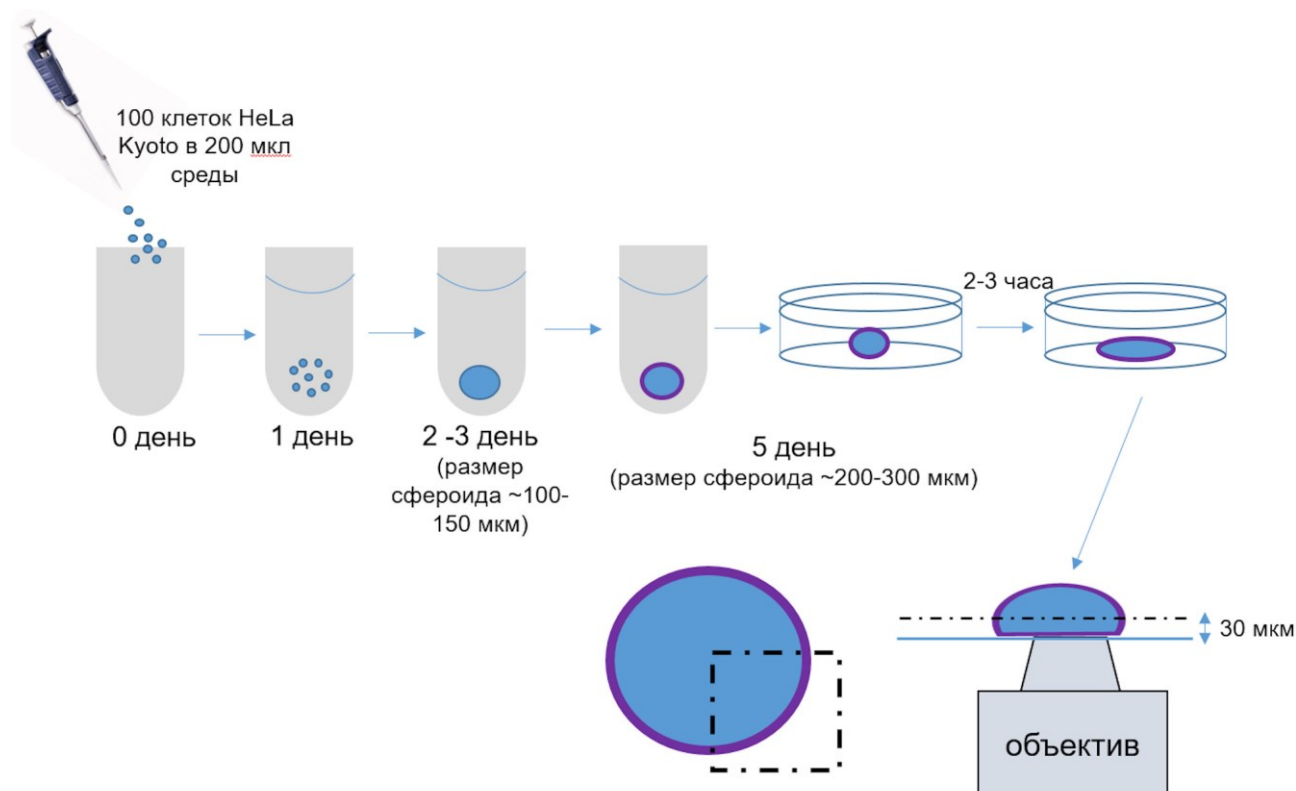


Рис.1. Методика метаболического имиджинга НАД(Ф)Н и ФАД опухолевых сфероидов.

Методика in vivo метаболического имиджинга опухолей животных на основе флуоресцентной микроскопии НАД(Ф)Н с временным разрешением.

Для формирования опухолей мышам подкожно вводили клетки HeLa Kyoto или CT26. Непосредственно перед экспериментом животное наркотизировали и над опухолью в стерильных условиях проводили препарирование кожного лоскута. Затем на опухоль ставили объектив от многофотонного флуоресцентного томографа MPTflex и проводили регистрацию сигнала НАД(Ф)Н. Схема эксперимента представлена на рисунке 2.

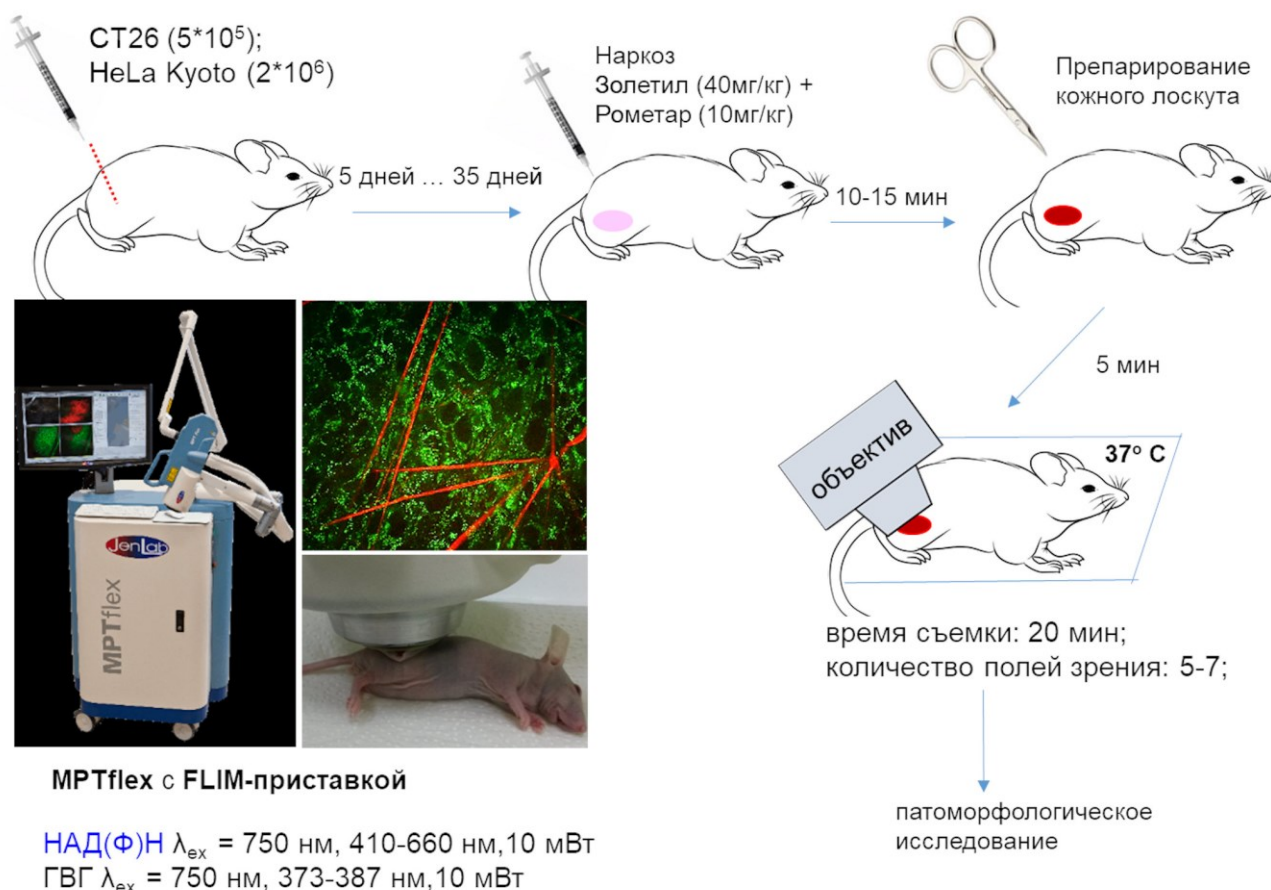


Рис.2. Методика *in vivo* метаболического имиджинга опухолей животных на основе флуоресцентной микроскопии НАД(Ф)Н с временным разрешением

Статистический анализ данных

Для каждой временной точки в эксперименте получали по 5-10 полей зрения, обсчет проводили по 30-80 клеткам. Полученные данные рассчитывали, как среднее значение (Mean) со стандартным отклонением (SD) или ошибкой среднего (SEM). Сравнительный анализ данных проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA10 (StatSoft, США), были выполнены t-критерий Стьюдента и дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Бонферрони. При $p < 0.05$ различия считались статистически значимыми.

Глава 3 содержит изложение и обсуждение результатов исследования.

1. Исследование метаболических изменений в опухолевых клетках монослойной клеточной культуры HeLa Kyoto при химиотерапии

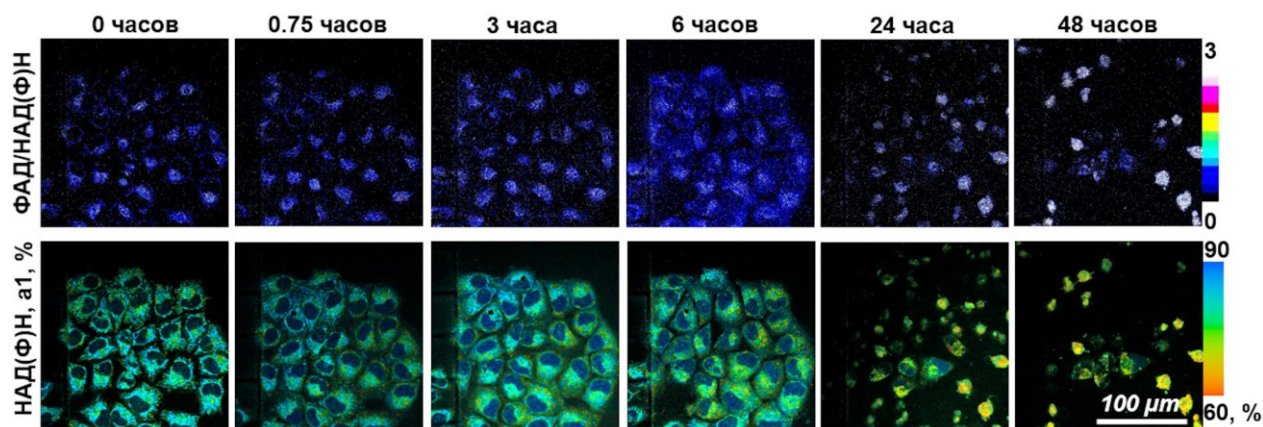
1.1. Исследование метаболических изменений в опухолевых клетках монослойной клеточной культуры HeLa Kyoto при химиотерапии цисплатином

Для исследования метаболических изменений в опухолевых клетках монослойной клеточной культуры HeLa Kyoto при воздействии цисплатином проводили мониторинг флуоресцентных параметров метаболических кофакторов в одних и тех же клетках в течении 48 ч после добавления препарата. Были зарегистрированы и проанализированы следующие параметры: интенсивности флуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД, редокс-отношение (ФАД/НАД(Ф)Н), а также времена жизни флуоресценции НАД(Ф)Н и его процентные вклады. При делении клеток на субпопуляции выживших и погибших не было выявлено статистически значимых различий. Было установлено, что мертвые клетки теряют автофлуоресценцию НАД(Ф)Н и ФАД, поэтому анализировался сигнал только от живых опухолевых клеток.

В процессе воздействия цисплатина мы наблюдали снижение интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н и увеличение – ФАД, что привело к росту значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н (рис. 3). Начиная с 6 ч после добавления препарата было выявлено статистически значимое увеличение редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н (от 0.52 ± 0.14 до 0.86 ± 0.16 , $p = 0.000001$). На временных точках 24 и 48 ч был обнаружен резкий скачек данного показателя (рис. 3). Описанные выше изменения в показателе редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н при воздействии цисплатина обратно коррелировали с пролиферативной активностью данных клеток ($r = -0.986$): чем выше значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н, тем менее активно клетки делились (рис. 3).

Были проанализированы времена жизни флуоресценции НАД(Ф)Н. Установлено, что в течении 6 ч воздействия цисплатина на клетки HeLa значения времен жизни свободного и связанного НАД(Ф)Н не менялись и составляли ~ 0.44 нс для короткой компоненты (t_1), и ~ 2.58 нс - для длинной компоненты (t_2). Дальнейшее инкубирование клеток с препаратом привело к незначительному увеличению времен жизни флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н до 0.48 нс и 2.71 нс для t_1 и t_2 соответственно. Значение процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н (a_1) в процессе воздействия цисплатина на клетки снижалось, начиная с 6 ч после добавления препарата (с $80.02 \pm 2.04\%$ до $77.82 \pm 1.69\%$, $p = 0.00017$) и до $66.34 \pm 1.71\%$, $p = 0.00001$) на 24 ч (рис. 3). Динамика изменения значения процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н прямо коррелировала с пролиферативной активности клеток ($r = 0.914$): чем выше было значение процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н, тем более активно делились клетки (рис. 3).

А



Б

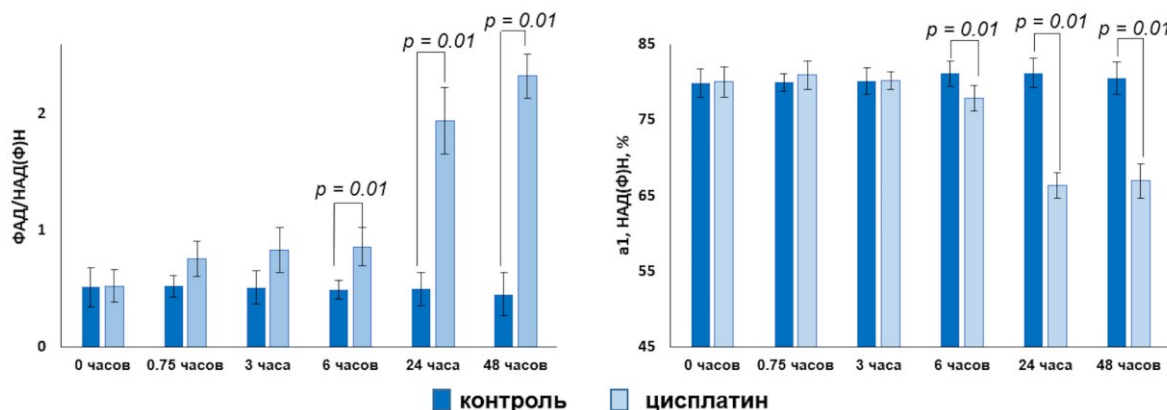


Рис. 3. Динамика изменения редокс – отношения ФАД/НАД(Φ)Н и времени жизни флуоресценции кофактора НАД(Φ)Н в опухолевых клетках HeLa в процессе воздействия цисплатина. (А – изображения редокс – отношения ФАД/НАД(Φ)Н и вклада свободной формы НАД(Φ)Н; Б – гистограммы изменения редокс – отношения ФАД/НАД(Φ)Н и вклада свободной формы НАД(Φ)Н). Масштабная линейка 100 μм. Среднее ± SD, n = 75.

Таким образом, в результате исследования влияния цисплатина на флуоресцентные показатели метаболических кофакторов НАД(Φ)Н и ФАД опухолевых клеток в монослойных клеточных культурах *in vitro* было показано, что значение редокс – отношения ФАД/НАД(Φ)Н статистически значимо растет, тогда как процентный вклад свободной формы НАД(Φ)Н существенно снижается после добавления химиопрепарата, что коррелирует со снижением пролиферативной активности клеток.

1.2. Исследование метаболических изменений в опухолевых клетках монослойной клеточной культуры HeLa Kyoto при химиотерапии паклитакселом.

Исследование метаболических особенностей опухолевых клеток проводили на монослойных клеточных культур HeLa Kyoto при химиотерапии паклитакселом в течении 24 ч в динамике. Для этого анализировали одни и те же клетки на протяжении всего эксперимента и регистрировали в них интенсивность флуоресценции кофакторов НАД(Φ)Н и ФАД и время жизни флуоресценции НАД(Φ)Н. На финальной точке клетки окрашивали на жизнеспособность. В качестве контроля использовали клетки без воздействия паклитакселом. В ходе исследования были выделены следующие популяции клеток: 1. живые, морфологически неизмененные клетки; 2. живые, морфологически измененные клетки; 3. мертвые клетки (клетки, окрашивающиеся, как мертвые

пропидиум иодидом, на временной точке 24 ч). Анализ параметров флуоресценции метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД проводили только в живых клетках.

В контрольных клетках не наблюдалось изменения значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н в течении первых 6 ч, а затем оно снижалось с 0.95 ± 0.12 до 0.51 ± 0.11 ($p = 0.00011$) через 24 ч после начала эксперимента (рис. 4). Тогда как во всех клетках, к которым добавляли паклитаксел, значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н постепенно увеличивались. Живые, морфологически неизмененные клетки демонстрировали наиболее выраженную динамику изменения значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н, чем две другие субпопуляции клеток в течении всего эксперимента (0.69 ± 0.11 до 1.15 ± 0.15 , $p = 0.00017$). В живых, морфологически измененных клетках наблюдался рост значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н с 0.62 ± 0.15 до 1.01 ± 0.11 ($p = 0.00021$) при воздействии паклитакселем. В мертвых клетках было установлено увеличение значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н с 0.67 ± 0.03 до 1.11 ± 0.21 ($p = 0.00038$). Важно отметить, что увеличение значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н в живых, морфологически измененных и мертвых клетках происходило, главным образом, из-за уменьшения интенсивности флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н (рис. 4), тогда как в живых, морфологически неизмененных клетках – из-за роста интенсивности флуоресценции кофактора ФАД (рис. 4).

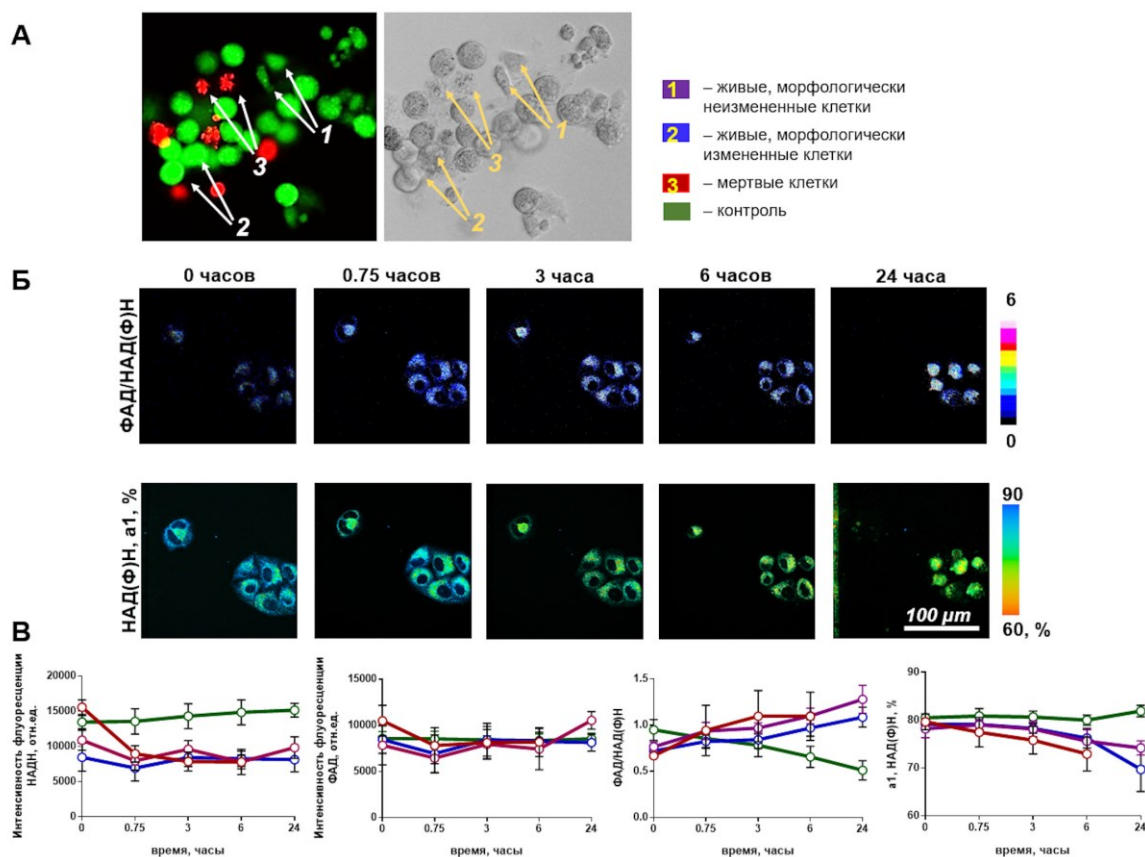


Рис. 4. Динамика изменения параметров флуоресценции метаболических кофакторов ФАД и НАД(Ф)Н в опухолевых клетках HeLa в процессе воздействия паклитаксела. (А – изображение жизнеспособности и морфологии клеток; Б – изображения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н и вклада свободной формы НАД(Ф)Н; В – диаграммы изменения флуоресцентных параметров кофакторов ФАД и НАД(Ф)Н). Масштабная линейка 100 μ m. Среднее $\pm$ SD, $n = 30$.

Также в динамике были проанализированы времена жизни флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н. Установлено статистически значимое увеличение времени жизни связанной формы НАД(Ф)Н с ~ 2.8 нс до ~ 3.2 нс ($p = 0.00111$) через 24 ч после добавления паклитаксела, как в живых, морфологически неизмененных, так и в морфологически измененных клетках. Было выявлено снижение значения процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н во всех клетках после добавления паклитаксела (рис. 4). Важно отметить, что характер изменения значения процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н связан с чувствительностью клеток к препарату. Наиболее ранние и выраженные изменения в значениях данного показателя были обнаружены в клетках, погибших через 24 ч после добавления препарата. Было показано снижение значения процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н уже через 0.75 ч после добавления паклитаксела к клеткам (рис. 4). В погибающих клетках значения процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н снизились наиболее выражено с $79.67 \pm 1.68 \%$ до $72.96 \pm 1.77 \%$, $p = 0.00011$) в течении 6 ч воздействия паклитаксела. В живых, морфологически измененных клетках значения процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н уменьшилось с $79.21 \pm 0.71 \%$ до $69.72 \pm 3.11 \%$ ($p = 0.00121$) через 24 ч после добавления паклитаксела. В живых, морфологически неизмененных клетках наблюдали снижение данного показателя с $79.23 \pm 1.18 \%$ до $74.19 \pm 1.47 \%$ ($p = 0.00851$) через 24 ч после добавления препарата. Стоит отметить, что наиболее ранние изменения наблюдались в клетках, погибших через 24 ч после добавления паклитаксела, тогда как наименее выраженные изменения в значении процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н были выявлены в субпопуляции живых, морфологически неизмененных клеток (рис. 4).

Таким образом, на монослойной клеточной культуре HeLa установлена возможность мониторинга параметров флуоресценции кофакторов в индивидуальных клетках в течение 48 ч. При воздействии паклитакселом показана различная динамика метаболических изменений: в погибающих клетках изменения в виде увеличения редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н и снижения вклада свободной формы НАД(Ф)Н зарегистрированы через 6 ч, тогда как в выживающих клетках со сниженной пролиферацией – через 24 ч после добавления препарата.

2. Метаболический имиджинг опухолевых сфероидов HeLa Kyoto при химиотерапии

2.1. Метаболический имиджинг опухолевых сфероидов HeLa Kyoto при химиотерапии цисплатином

В ходе эксперимента осуществляли мониторинг флуоресцентных параметров метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в опухолевых сфероидах с 3 ч и до 48 ч после добавления препарата. В качестве контроля были использованы сфероиды без воздействия. Опухолевые сфероиды представляют собой гетерогенные образования, состоящие из клеток в различных пролиферативных и метаболических состояниях. Известно, что сфероиды с радиусами более 200 μm имеют оболочку, состоящую из активно пролиферирующих клеток, и центр, состоящий из покоящихся клеток внутри (из-за сниженного доступа питательных веществ

и кислорода) (Zanoni, et. al., 2016). В связи с этим, анализ значений редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н и времен жизни флуоресценции НАД(Ф)Н проводили отдельно для клеток наружного и внутреннего слоев.

Было продемонстрировано, что в клетках внутреннего и наружного слоев контрольных сфероидов значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н не различались. Однако, вклад свободной формы НАД(Ф)Н (a1) в клетках наружного и внутреннего слоя был различен. Активно пролиферирующие клетки наружного слоя имели более высокие значения вклада свободной формы НАД(Ф)Н, чем клетки внутреннего слоя на 6 и 7 дни роста (79.17 ± 0.81 против 75.13 ± 0.87 , $p = 0.00014$) (рис. 5), что, вероятно, является следствием более высокой скорости гликолитических реакций и согласуется с общим принципом метаболической организации опухолевых сфероидов. Никаких значительных изменений в параметрах флуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в клетках сфероидов с 5 по 7 день в процессе естественного роста не наблюдалось.

В результате действия цисплатина наблюдали рост значения редокс-отношение ФАД/НАД(Ф)Н в опухолевых клетках леченых сфероидов уже через 3 ч после добавления препарата по сравнению с контрольными, нелечеными сфероидом (~ 0.36 против ~ 0.25 , $p = 0.00001$). Данная закономерность наблюдалась как в клетках центральной зоны сфероида (внутренний слой), так и наружной (наружный слой). В течении 48 ч после добавления цисплатина значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н продолжало расти в клетках леченых сфероидов, по сравнению с контрольными нелечеными сфероидом и составляло, соответственно ~ 0.44 против ~ 0.33 ($p = 0.00001$).

Исследование времен жизни флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н не выявило статистически значимых различий между лечеными и контрольными сфероидом, и составляло ~ 0.45 нс для свободной формы НАД(Ф)Н и ~ 2.45 нс для связанной с белками формы НАД(Ф)Н. При анализе процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н в опухолевых сфероидом при химиотерапии цисплатином было показано, что значения данного параметра в клетках наружного слоя росли спустя 3 ч после добавления препарата по сравнению с контролем ($79.06 \pm 0.31\%$ против $75.25 \pm 1.98\%$, $p = 0.00011$), а затем статистически значимо снижались спустя 24 ч воздействия химиопрепарата ($72.41 \pm 1.91\%$ против $79.17 \pm 0.81\%$, $p = 0.00011$). Тогда как в клетках внутреннего слоя сфероида значения процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н статистически значимо были выше по сравнению с контролем, начиная с 6 ч после воздействия препарата ($76.57 \pm 0.77\%$ против $74.53 \pm 0.78\%$, $p = 0.00113$). Спустя 48 ч после добавления цисплатина значения данного показателя достоверно снизились по сравнению с контролем ($69.07 \pm 2.45\%$ против $74.01 \pm 2.11\%$, $p = 0.00011$).

Таким образом, было установлено, что в пролиферирующих клетках наружного слоя вклад свободной формы НАД(Ф)Н выше, чем в покоящихся клетках внутреннего слоя, что говорит о метаболической гетерогенности сфероида. В результате исследования влияния цисплатина на

флуоресцентные показатели метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в клетках опухолевого сфероиды было выявлено, что значение редокс – отношение ФАД/НАД(Ф)Н увеличивалось, а вклад свободной формы НАД(Ф)Н снижался в клетках наружного слоя сфероиды в период 3-48 ч после лечения цисплатином.

2.2. Метаболический имиджинг опухолевых сфероидов HeLa Kyoto при химиотерапии паклитакселом.

Показано увеличение значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н, начиная с 6 ч после добавления с паклитаксела в клетках наружного и внутреннего слоев сфероиды по сравнению с контролем (~ 0.55 против ~ 0.35 , $p = 0.00011$) (рис. 5). Редокс – отношение ФАД/НАД(Ф)Н продолжало расти в течении 48 ч после добавления препарата по сравнению с контролем и достигало ~ 0.75 ($p = 0.00001$).

Анализ времен жизни флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н не выявил статистически значимых отличий лечеными и контрольными сфероиды и их значения соответствовали ~ 0.42 нс для свободной формы НАД(Ф)Н и ~ 2.43 нс для связанной с белком формы НАД(Ф)Н. Показано статистически значимое увеличение значения вклада свободной формы НАД(Ф)Н в клетках внутреннего слоя сфероиды уже через 3 ч после добавления паклитаксела по сравнению с контролем (76.31 ± 0.51 % против 74.93 ± 0.82 %, $p = 0.00152$). Тогда как в клетках наружного слоя опухолевого сфероиды обнаружено статистически значимое снижение значения вклада свободной формы НАД(Ф)Н через 6 ч после добавления препарата по сравнению с контрольными нелечеными сфероиды (73.69 ± 1.75 % против 80.25 ± 1.24 %, $p = 0.00001$) (рис. 5).

Таким образом, выявлено увеличение значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н во всех клетках опухолевого сфероиды после лечения паклитакселом. Показано, что значения вклада свободной формы НАД(Ф)Н в пролиферирующих клетках наружного слоя опухолевого сфероиды снижались, а в покоящихся клетках внутреннего слоя увеличивались при воздействии паклитаксела.

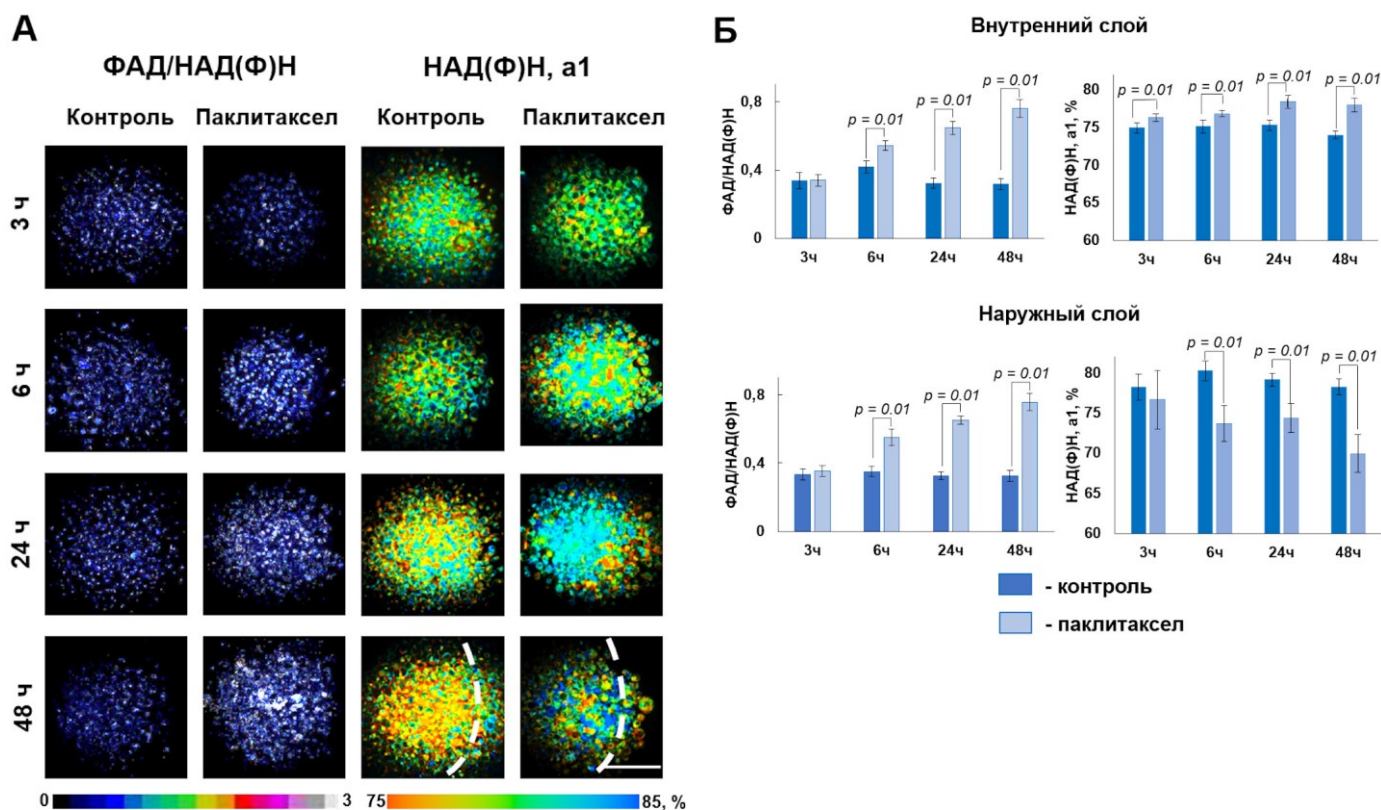


Рис. 5. Динамика изменения флуоресцентных параметров метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в опухолевых сфероидах HeLa при химиотерапии паклитакселом (А – флуоресцентные изображения НАД(Ф)Н и ФАД; Б – гистограммы редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н и вклада свободной формы НАД(Ф)Н (а1)). Mean $\pm$ SEM, n = 3-4 сфероида. Масштабная линейка 30 μ м.

3. *In vivo* флуоресцентная микроскопия с временным разрешением НАД(Ф)Н в мышинных опухолевых моделях при химиотерапии

3.1. *In vivo* флуоресцентная микроскопия с временным разрешением НАД(Ф)Н в опухоли HeLa Kyoto при химиотерапии цисплатином

Флуоресценция ФАД в опухолях была очень слабая, что не позволило адекватно рассчитать редокс-отношение ФАД/НАД(Ф)Н. В связи с этим, основным показателем для оценки метаболического статуса опухолевых клеток *in vivo* в процессе лечения был анализ времени жизни метаболического кофактора НАД(Ф)Н. Регистрацию флуоресценции НАД(Ф)Н проводили на 35 день опухолевого роста.

Было показано, что выбранная схема лечения приводит к торможению опухолевого роста во всех леченых опухолях по сравнению с контрольными опухолями без воздействия. Патоморфологическое исследование контрольных опухолей без лечения показало, что опухолевая ткань состояла из крупных полиморфных клеток с округлыми или овальными крупными светлыми ядрами преимущественно с диффузным мелкодисперсным распределением хроматина и 1-2 ядрышками. Опухоли после химиотерапии цисплатином характеризовались обширными полями некрозов. В ткани опухоли наблюдались клетки с вакуолизацией цитоплазмы, отеком и просветлением ядра, встречались немногочисленные клетки с признаками апоптоза. В целом опухоли после лечения цисплатином характеризовались сниженным количеством жизнеспособных клеток без морфологических изменений.

Анализ времен жизни флуоресценции свободной и связанной с белками форм НАД(Ф)Н не выявил отличий между лечеными и контрольными опухолями; значения составляли ~ 0.5 нс для свободной формы НАД(Ф)Н и ~ 2.5 нс для связанной с белками формы НАД(Ф)Н. Продemonстрировано, что процентный вклад свободной формы НАД(Ф)Н статистически значимо снижался в опухолях после лечения цисплатином по сравнению с контрольными опухолями ($71.22 \pm 3.86\%$ против $79.48 \pm 2.87\%$, $p = 0.00001$). Более низкое значение процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н в опухолях после лечения цисплатином, согласуется с данными, полученными в *in vitro* экспериментах, и могут указывать на снижение гликолитической активности и смещение метаболического статуса в сторону митохондриального дыхания в опухолях.

Таким образом, в результате исследования на опухолевой модели HeLa показана возможность прижизненной визуализации метаболического статуса на клеточном уровне. Установлено, что в опухолевых клетках *in vivo* после лечения цисплатином снижалось значение процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н. Полученный результат согласуется с данными *in vitro* экспериментов, описанных выше.

3.2. In vivo флуоресцентная время-разрешенная микроскопия НАД(Ф)Н опухоли СТ26 при химиотерапии препаратами с разным механизмом действия

Исследование изменения параметров времени жизни флуоресценции метаболического кофактора НАД(Ф)Н в опухолевых клетках при химиотерапии препаратами с разным механизмом действия проводили на мышах линии Balb/C с подкожно привитыми опухолями СТ26. Были использованы препараты цисплатин, паклитаксел и иринотекан, которые применяются в клинике для лечения колоректального рака. Регистрацию флуоресценции НАД(Ф)Н проводили на 7, 14 и 21 дни опухолевого роста. В качестве контроля были использованы опухоли на тот же день без лечения.

Анализ динамики роста опухоли СТ26 в течение 21 дня показал, что все препараты оказывали ингибирующее действие на опухоли в применяемых схемах лечения. На 7 день опухоли во всех леченых группах не отличалась по размеру от контрольных нелеченых опухолей. Статистически значимые различия в размерах леченых и нелеченых опухолей были зарегистрированы только на 14 и 21 день опухолевого роста. Препараты цисплатин и иринотекан ингибировали опухолевый рост более выраженно, чем паклитаксел (рис. 6).

Патоморфологический анализ показал, что контрольные опухоли характеризовались плотной структурой и состояли из полиморфных клеток различного размера с крупными круглыми или овальными ядрами, содержащими диффузно распределенный хроматин и 1-2 ядрышки. Базофильная цитоплазма была сформирована в виде тонкого кольца вокруг ядра клетки. Опухоли имели высокую митотическую активность. На 7 день опухолевого роста встречались единичные некротические клетки, тогда как на 14 и 21 дни были обнаружены значительные участки спонтанного некроза (рис. 6). При исследовании леченых опухолей было выявлено, что на 7 день

все опухоли в леченых группах не отличались по морфологии от контрольных нелеченых опухолей. На 14 день было показано, что во всех леченых опухолях, вне зависимости от вида препарата, наблюдались выраженные дистрофические изменения. Леченые опухоли характеризовались вакуолизацией цитоплазмы, отеками, сниженным количеством жизнеспособных опухолевых клеток. Обнаружено снижение митотической активности клеток и увеличение площадей некроза. На 21 день поля некроза занимали ~ 70% площади всей опухоли в группах с цисплатином и паклитакселом и ~ 90% - в группе с иринотеканом (рис. 6).

Анализ среднего времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н (t_m) показал статистически значимо увеличение данного параметра по сравнению с контролем на 14 день опухолевого роста в опухолях, леченых цисплатином (1.02 ± 0.08 нс против 0.85 ± 0.09 нс, $p = 0.00062$) и иринотеканом (1.01 ± 0.09 нс против 0.85 ± 0.09 нс, $p = 0.00011$), и во всех леченых группах на 21 день (0.92 ± 0.08 нс; 0.98 ± 0.05 нс и 0.97 ± 0.08 нс против 0.71 ± 0.13 нс ($p = 0.00011$)). Значения процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н (a_1) в ходе химиотерапии снижались, начиная с 7 дня во всех леченых группах по сравнению с контролем (79.12 ± 0.11 %; 79.52 ± 0.86 % и 78.68 ± 1.05 % против 81.78 ± 1.56 %, $p \leq 0.00115$) (рис. 6). Снижение значений a_1 НАД(Ф)Н продолжалось на 14 и 21 дни опухолевого роста во всех леченых группах по сравнению с контролем (рис. 6).

Важно отметить, что степень изменений значения a_1 НАД(Ф)Н коррелировала с выраженностью ответа опухоли на лечение. В опухолях, леченых паклитакселом, наблюдалось наименьшее торможение опухолевого роста, по сравнению с остальными лечеными группами, и изменения в значении отношения a_1 НАД(Ф)Н были наименее выраженными. Стоит отметить, что изменения в параметрах времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н, вызванные химиотерапией, обнаруживались до того, как лечебный эффект обнаруживался стандартными методами (измерение скорости роста опухоли и патоморфологический анализ), а характер изменений не зависел от механизма действия препарата и был аналогичен для цисплатина, паклитаксела и иринотекана.

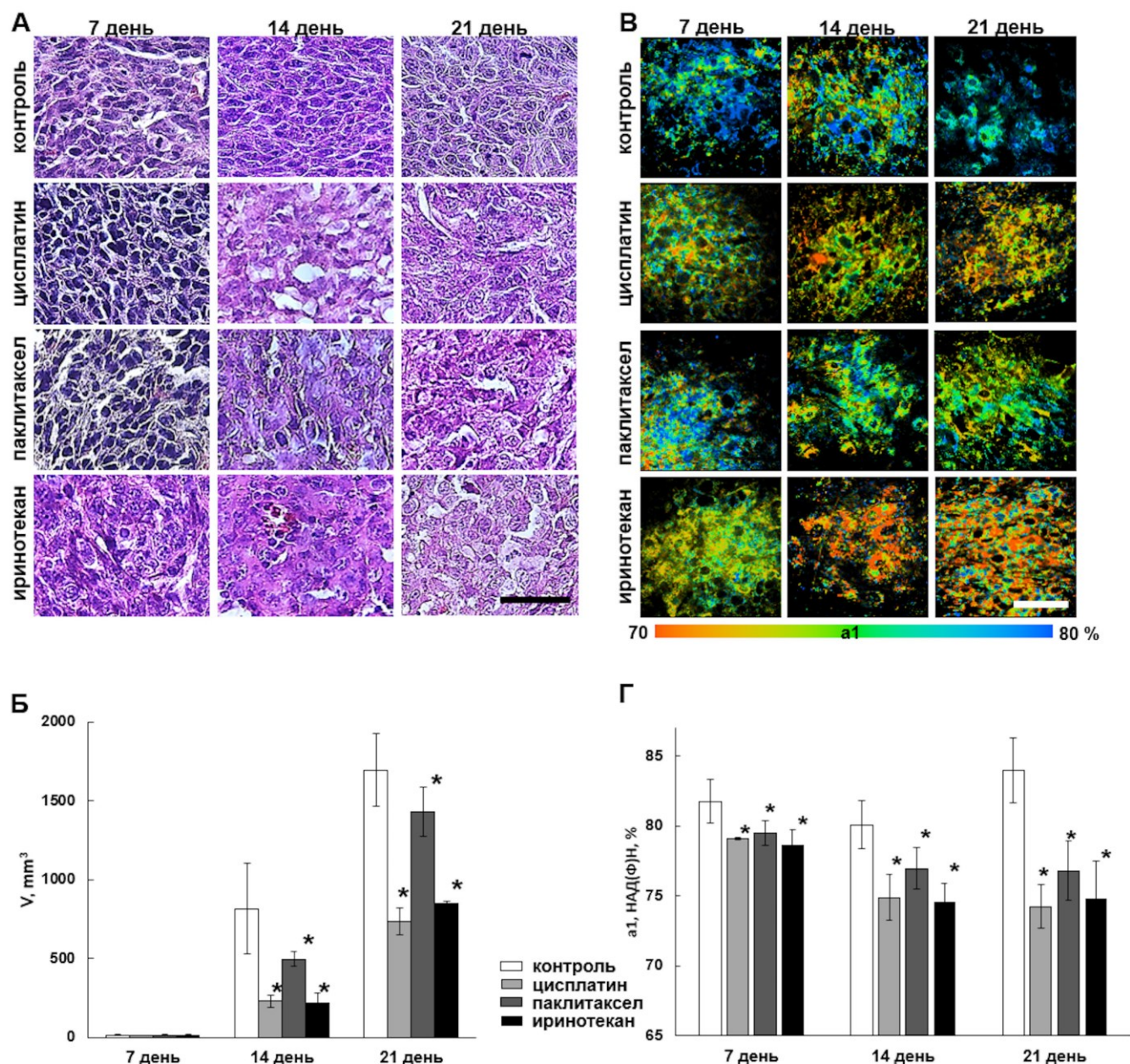


Рис. 6. Ответ опухоли СТ26 на химиотерапию цисплатином, паклитакселом и иринотеканом. (А – Патоморфологический анализ; Б – Гистограмма опухолевого роста; В – FLIM-изображения вклада свободной формы НАД(Ф)Н; Г – Гистограмма вклада свободной формы НАД(Ф)Н). (*) - статистически значимое отличие от нелеченых контрольных опухолей на тот же день, $p \leq 0.05$, среднее значение $\pm$ SEM, $n = 5$ опухолей. Масштабная линейка 80 мкм.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методики оценки метаболического статуса живых опухолевых клеток на основе флуоресцентной время-разрешенной микроскопии эндогенных кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД для моделей с различной организацией: монослойных клеточных культур, сфероидов и подкожных опухолей мышей.

2. С помощью разработанных методик показаны аналогичные изменения метаболических параметров в опухолевых клетках *in vitro* и *in vivo* в ответ на химиотерапию: увеличение редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н и снижение вклада свободного НАД(Ф)Н. Установлено, что данные изменения типичны для препаратов цисплатин, паклитаксел и иринотекан, имеющих различный механизм действия.

3. На монослойных клеточных культурах установлена возможность мониторинга параметров флуоресценции кофакторов в индивидуальных клетках в течение 48 ч. На клетках монослойной культуры HeLa при воздействии паклитакселом показана различная динамика метаболических изменений. В погибающих клетках изменения в виде увеличения редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н с 0.67 ± 0.03 до 1.11 ± 0.21 ($p = 0.00038$) и снижения вклада свободной формы НАД(Ф)Н с $79.67 \pm 1.68 \%$ до $72.96 \pm 1.77 \%$ ($p = 0.00011$) зарегистрированы через 6 ч, тогда как в выживающих клетках со сниженной пролиферацией – через 24 ч после добавления препарата.

4. На опухолевых сфероиды продемонстрирована метаболическая гетерогенность – в пролиферирующих клетках наружного слоя вклад свободной формы НАД(Ф)Н выше, чем в покоящихся клетках внутреннего слоя ($79.17 \pm 0.81 \%$ против $75.13 \pm 0.87 \%$, $p = 0.00014$). Обнаружено увеличение редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н и снижение вклада свободной формы НАД(Ф)Н в клетках наружного слоя сфероида в период 3-48 ч после воздействия цисплатином и паклитакселом.

5. На мышинных опухолевых моделях HeLa и CT26 проведена прижизненная визуализация метаболического статуса на клеточном уровне. Установлено, что при лечении химиопрепаратами с различными механизмами действия вклад свободной формы НАД(Ф)Н в опухоли CT26 снижается по сравнению с контролем ($p \leq 0.00115$), начиная с 7 дня роста, до морфологических и ростовых проявлений ответа опухоли на лечение.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из списка, рекомендованных ВАК:

1. **Lukina MM**, Dudenkova VV, Ignatova NI, Druzhkova IN, Shimolina LE, Zagaynova EV, Shirmanova MV. Metabolic cofactors NAD(P)H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel // *Biochim Biophys Acta*. 2018. V. 1862(8). P. 1693-1700.

2. Shirmanova MV, Druzhkova IN, **Lukina MM**, Dudenkova VV, Ignatova NI, Snopova LB, Shcheslavskiy VI, Belousov VV, Zagaynova EV. Chemotherapy with cisplatin: insights into intracellular pH and metabolic landscape of cancer cells in vitro and in vivo // *Scientific Reports*. 2017. V. 7(1). P. 8911.

3. **Lukina M**, Orlova A, Shirmanova M, Shirokov D, Pavlikov A, Neubauer A, Studier H, Becker W, Zagaynova E, Yoshihara T, Tobita S, Shcheslavskiy V. Interrogation of metabolic and oxygen states of tumors with fiber-based luminescence lifetime spectroscopy // *Optics Letters*. 2017. V. 42(4). P. 731-734.

4. Druzhkova IN, Shirmanova MV, **Lukina MM**, Dudenkova VV, Mishina NM, Zagaynova EV. The metabolic interaction of cancer cells and fibroblasts - coupling between NAD(P)H and FAD, intracellular pH and hydrogen peroxide // *Cell Cycle*. 2016. V. 15(9). P. 1257-66.

5. **Лукина М.М.**, Ширманова М.В., Сергеева Т.Ф., Загайнова Е.В. Метаболический имиджинг в исследовании онкологических процессов (обзор) // *Современные технологии в медицине*. 2016. Т. 8(4), С. 113-124.

6. **Lukina MM**, Dudenkova VV, Shimolina LE, Snopova LB, Zagaynova EV, Shirmanova MV. In vivo metabolic and SHG imaging for monitoring of tumor response to chemotherapy// *Cytometry A*. 2019. V. 95(1). P. 47-55.

7. **Lukina MM**, Shimolina LE, Kiselev NM, Zagaynov VE, Komarov DV, Zagaynova EV, Shirmanova MV. Interrogation of tumor metabolism in tissue samples ex vivo using fluorescence lifetime imaging of NAD(P)H // *Methods and Applications in Fluorescence*. 2019. V. 8(1). P. 1-11.

8. Sergeeva TF, Shirmanova MV, Zlobovskaya OA, Gavrina AI, Dudenkova VV, **Lukina MM**, Lukyanov KA, Zagaynova EV. Relationship between intracellular pH, metabolic co-factors and

Тезисы конференций:

1. **Лукина ММ**, Шимолина ЛЕ, Дуденкова ВВ, Игнатова НВ, Дружкова ИН, Полозова АВ, Щеславский ВИ, Загайнова ЕВ, Ширманова МВ. Исследование изменения энергетического метаболизма в опухолевых клетках при химиотерапии // Сборник научных трудов VI Съезда биофизиков России. Сочи, 16–21 сентября 2019 г. С. 212-213.
2. **Lukina MM**, Shimolina LE, Druzhkova IN, Ignatova NI, Reunov DG, Zagaynov VE, Komarov DV, Medyanik IA, Kritchenkov IS, Zagaynova EV, Shirmanova MV. Metabolic imaging of tumor samples from patients // VII International Symposium Topical problems of biophotonics. 2019. P. 152-153.
3. **Лукина ММ**, Шимолина ЛЕ, Дружкова ИН, Дуденкова ВВ, Игнатова НИ, Ширманова МВ, Реунов ДГ, Медяник ИА, Загайнова ЕВ. Исследование метаболического статуса опухолей пациентов с помощью время-разрешенного флуоресцентного имиджинга кофактора НАДН // Сборник тезисов X Съезда онкологов России. Нижний Новгород, 17–19 апреля 2019 г. С. 83.
4. **Лукина ММ**, Шимолина ЛЕ, Дуденкова ВВ, Игнатова НВ, Дружкова ИН, Полозова АВ, Ширманова МВ. Исследование метаболической реакции опухолевых клеток на химиотерапию // Сборник тезисов по материалам конференции «Биосистемы: организация, поведение, управление»: 72-я Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых. Нижний Новгород, 23–26 апреля 2019 г. С. 140.
5. **Лукина ММ**, Дуденкова ВВ, Шимолина ЛЕ, Игнатова НВ, Дружкова ИН, Павлова НП, Ширманова МВ. Исследование метаболического ответа опухолевых клеток на химиотерапию // Сборник тезисов по материалам конференции «Биосистемы: организация, поведение, управление»: 71-я Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых. Нижний Новгород, 17–20 апреля 2018 г. С. 139.
6. **Лукина ММ**, Дружкова ИН, Дуденкова ВВ, Шимолина ЛЕ, Игнатова НИ, Ширманова МВ. Исследование энергетического метаболизма опухоль-ассоциированных фибробластов, выделенных из опухоли пациента // Материалы XXIII Нижегородской сессии молодых учёных (технические, естественные, математические науки). 2018. С. 131.
7. **Лукина ММ**, Дружкова ИН, Дуденкова ВВ, Шимолина ЛЕ, Игнатова НИ, Загайнова ЕВ, Ширманова МВ. Исследование опухолевого метаболизма методом многофотонной микроскопии с временным разрешением // Злокачественные опухоли (материалы XXII Российского онкологического конгресса). 2018. Т. 8(3) (спец выпуск). С. 118.
8. Druzhkova IN, **Lukina MM**, Dudenkova VV, Shimolina LE, Zagaynova EV, Shirmanova MV. Insight into microenvironment of tumor on the microscopic level with a focus on cancer-associated fibroblasts // Proc. SPIE, Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care VI. 2018. P. 106852R-1-9.
9. Zagaynova EV, Shirmanova MV, **Lukina MM**, Dudenkova VV, Ignatova NI, Elagin VV, Shlivko IL, Scheslavsky VI, Orlinskay NY. Metabolic imaging of tumor for diagnosis and response for therapy // Proceedings of SPIE: Progress in Biomedical Optics and Imaging. V. 10498. 2018. P. 154.
10. **Lukina MM**, Shirmanova MV, Dudenkova VV, Pavlova NP, Snopova LB, Zagaynova EV. Metabolic imaging of cancer cells using fluorescence lifetime microscopy // VI International Symposium Topical problems of biophotonics. 2017. P. 92.
11. **Lukina MM**, Dudenkova VV., Shumilova AV, Snopova LB, Zagaynova EV, Shirmanova MV. In vitro and in vivo metabolic imaging of cervical cancer // Proceedings of the 12th Workshop on Advanced Multiphoton and Fluorescence Lifetime Imaging Techniques FLIM 2017. P. 154.
12. **Lukina MM**, Dudenkova VV, Shumilova AV, Snopova LB, Zagaynova EV, Shirmanova MV. In vivo metabolic imaging of mouse tumor models in response to chemotherapy // SPIE Photonics West, BIOS. 10069. Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XVII. 100692G. 2017. P. 178.
13. Shirmanova MV, **Lukina MM**, Shimolina LE, Kuimova MK, Dudenkova VV, Shcheslavskiy VI, Zagaynova EV. Probing energy metabolism and microviscosity in cancer using FLIM // SPIE Photonics European Conference on Biomedical Optics. 2017. P. 124.

14. **Лукина ММ**, Шимолина ЛЕ, Дуденкова ВВ, Шумилова АВ, Ширманова МВ. Исследование метаболического статуса опухолевых клеток при химиотерапии. Материалы III Всероссийской 14-й межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем медицины» МедиАль Т. 1 (19). 2017. С. 367-368.
15. **Lukina MM**, Shirmanova MV, Shimolina LE, Sergeeva TF, Perelman GP, Shumilova AV, Snopova LB, Zagaynova EV. Energy metabolism in murine colon carcinoma in vivo after chemotherapy// The 1-st school on AD Fluorescence lifetime imaging FRC for Biotechnonology. 2016. P 43.
16. **Lukina MM**, Shirmanova MV, Dudenkova VV, Druzhkova IN, Shumilova AV, Zagaynova EV. Analysis of energy metabolism of HeLa cancer cells in vitro and in vivo using fluorescence lifetime microscopy // SPIE Photonics Europe. 2016. P. 345.
17. **Лукина ММ**, Дуденкова ВВ, Ширманова МВ. Исследование энергетического метаболизма опухолевых клеток при химиотерапии // Материалы 20-й сессии молодых учёных - Естественные науки 2015. С. 141-142.
18. **Лукина ММ**, Дуденкова ВВ, Ширманова МВ. Исследование метаболических кофакторов методом FLIM в опухолевых и нормальных клетках in vitro // Материалы II Всероссийской XIII Межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов. 2015. С. 114.
19. **Лукина ММ**, Дружкова ИН, Дуденкова ВВ, Ширманова МВ. In vitro исследование метаболических кофакторов в опухолевых и нормальных клетках методом флуоресцентной микроскопии с временным разрешением // Российский биотерапевтический журнал. 2015. Т.1. С. 101.
20. **Лукина ММ**, Дуденкова ВВ, Ширманова МВ. Исследование метаболических кофакторов в опухолевых и нормальных клетках in vitro методом FLIM // Материалы 20-й сессии молодых учёных - Естественные науки. 2015. С. 258.
21. **Lukina MM**, Dudenkova VV, Shirmanova MV, Zagaynova EV. Study of NADH and FAD in cancer and normal cells in vitro using FLIM // Proceedings of International Symposium Topical problems of biophotonics-2015. 2015. P. 284-285.