

На правах рукописи

Ширманова Марина Вадимовна

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННЫЙ ИМИДЖИНГ
ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

1.5.2 – Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук
в виде научного доклада

Нижний Новгород – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава РФ).

Научный консультант: Загайнова Елена Вадимовна

доктор медицинских наук, профессор РАН, член-корреспондент РАН, заместитель генерального директора по развитию Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	4
2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДОКЛАДА.....	18
2.1. Основы оптического метаболического имиджинга.....	18
2.2. Методики оценки энергетического метаболизма клеток с помощью FLIM.....	22
2.2.1. FLIM-микроскопия НАД(Ф)Н и ФАД, редокс-отношение.....	22
2.2.2. FLIM НАД(Ф)Н на макро-уровне.....	25
2.3. Принципы мультипараметрического имиджинга с использованием FLIM НАД(Ф)Н.....	25
2.4. Особенности энергетического метаболизма опухолей в условиях естественного роста по данным FLIM.....	29
2.4.1. FLIM-микроскопия опухолевых сфероидов, опухолей мышей <i>in vivo</i> и образцов опухолей пациентов.....	29
2.4.2. Возможности макро-FLIM для дифференцирования опухоли от нормальной ткани.....	36
2.5. Исследование метаболических изменений при апоптозе опухолевых клеток с использованием FLIM НАД(Ф)Н и генетически кодируемого сенсора активности каспазы-3.....	38
2.6. Оценка ответа опухолей на химиотерапию с помощью оптического метаболического имиджинга.....	41
2.6.1. Изменение энергетического метаболизма опухолевых клеток при химиотерапии в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	42
2.6.2. Химиотерапия первичных культур опухолевых клеток.....	46
2.7. Метаболический ответ опухолевых клеток на ФДТ по данным FLIM.....	48
2.7.1 FLIM НАД(Ф)Н при ФДТ с генетически кодируемым фотосенсибилизатором KillerRed.....	49
2.7.2 FLIM НАД(Ф)Н при ФДТ с фотодитазином.....	51
2.8. Взаимосвязь энергетического метаболизма и кислородного статуса опухолевых клеток по данным FLIM и PLIM.....	52
2.8.1. Методики комбинированной оценки флуоресценции кислородных сенсоров и автофлуоресценции НАД(Ф)Н в опухолях с помощью PLIM и FLIM.....	54
2.8.2. PLIM и FLIM при химиотерапии и ФДТ.....	57
2.9. Связь энергетического метаболизма с физико-химическими показателями опухолевых клеток - pH и вязкостью.....	62
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.....	69
4. СПИСОК НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ЗА ПОСЛЕДНИЕ 10 ЛЕТ, В КОТОРЫХ ИЗЛОЖЕНЫ ОСНОВНЫЕ НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ.....	76
5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	84

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Злокачественные опухоли отличаются от нормальных тканей целым рядом биологических особенностей, включая неконтролируемую пролиферацию, способность к инвазии и метастазированию, адаптацию к гипоксии и стимуляцию ангиогенеза, устойчивость к апоптозу, уклонение от иммунного надзора и др. [1]. Существенную роль в поддержании опухолевого роста и регуляции жизнедеятельности опухолевой клетки играют изменения в клеточном метаболизме, касающиеся в первую очередь процессов дыхания. Согласно современным представлениям, эти метаболические перестройки являются не просто следствием молекулярно-генетических нарушений, лежащих в основе патогенеза опухоли, а необходимым условием опухолевой прогрессии [2]. Метаболические пути, обеспечивая клетку энергией и субстратами, как бы опосредуют все проявления особого биологического поведения опухолей и устойчивость к цитотоксическим воздействиям. Поэтому исследование опухолевого метаболизма имеет огромное значение для понимания механизмов канцерогенеза и разработки новых диагностических и терапевтических подходов.

Злокачественная трансформация клеток приводит к кардинальным изменениям всех видов обменных процессов, что обусловлено, прежде всего, высокой потребностью опухолевых клеток в энергии и макромолекулах для пролиферации и интенсивного роста клеточной массы. К наиболее значимым метаболическим изменениям относят повышенный уровень гликолиза, как анаэробного, так и аэробного (эффект Варбурга), митохондриальную дисфункцию, активацию пентозофосфатного пути, использование глутамина и жирных кислот в качестве альтернативных энергетических субстратов, активный биосинтез липидов и нуклеотидов [3, 4]. Результатом активации гликолиза является продукция лактата и, как следствие, обратный градиент внутри- и внеклеточного рН, который способствует развитию и выживанию опухоли [5].

Исследования последних лет выявили, что нет единой, универсальной метаболической программы, свойственной всем опухолям и даже клеткам внутри одной опухоли [6]. Опухолевые клетки способны активировать различные пути получения энергии в зависимости от текущих потребностей и условий микроокружения. Большинство раковых клеток используют гликолиз и митохондриальное дыхание одновременно, а интенсивность этих процессов определяется множеством факторов, относящихся как к самим опухолевым клеткам, так и их микроокружению [A49]. К эндогенным факторам относят тканевое происхождение опухоли, специфику метаболических процессов в том типе ткани и органе, где локализована опухоль, генетические характеристики и молекулярный подтип, степень дифференцировки. Факторами, связанными с микроокружением, являются

распределение кислорода, доступность и состав питательных веществ, pH среды, взаимодействие со стромальными клетками, плотность коллагенового матрикса. Очевидно, что опухоли гетерогенны на генетическом, молекулярном и клеточном уровне, что в совокупности с неоднородным и постоянно меняющимся микроокружением обуславливает высокую внутри- и межопухолевую гетерогенность их энергетического метаболизма. Присутствие внутри одной опухоли клеток с преобладанием разных путей получения энергии повышает вероятность выживания отдельных клеточных клонов при терапии и развития резистентности, а метаболические отличия между опухолями одного типа и стадии у разных пациентов подчеркивают необходимость персонализированного лечения. Высокая пластичность катаболических процессов в опухолевых клетках позволяет им приспосабливаться к неблагоприятным условиям, например, недостатку кислорода, питательных веществ, а в ряде случаев - к действию противоопухолевых препаратов.

Важным аспектом в исследованиях опухолевого метаболизма является связь энергетического метаболизма клеток с ответом на лечение [7, 8]. Так, аэробный гликолиз обычно ассоциируется с агрессивностью опухоли и лекарственной устойчивостью [9]. В то же время, цитотоксическая терапия наиболее эффективна в отношении активно пролиферирующих клеток, для которых так же свойствен гликолиз, а более резистентные субпопуляции опухолевых стволовых клеток имеют окислительный метаболизм [10]. При этом сама противоопухолевая терапия может менять метаболизм опухолевых клеток посредством множества путей, например, при прямом действии на митохондрии или косвенно в ответ на повреждение ядерной ДНК клеток или снабжающих опухоль кровеносных сосудов [11-15]. Идентификация метаболических «маркеров» терапевтического ответа или резистентности является актуальной задачей и может стать основой для разработки новых способов прогнозирования и мониторинга эффективности противоопухолевой терапии.

Механизмы, с помощью которых раковые клетки координируют свою биоэнергетику, и условия, при которых активируются те или иные пути получения энергии, до сих пор малопонятны. Это диктует необходимость поиска новых методов оценки энергетического метаболизма с возможностью динамического наблюдения как за индивидуальными клетками, так и опухолью в «макро» масштабе. Особый интерес представляют мультипараметрические исследования с одновременной оценкой сразу нескольких комплементарных параметров в одной и той же опухоли или отдельно взятой клетке.

Развитие методов флуоресцентного имиджинга с временным разрешением (Fluorescence Lifetime Imaging, FLIM) привело к созданию новых подходов для исследования различных биологических процессов и физико-химических параметров клеток и тканей [16-18, A21]. Подобно

другим методам оптического биоимиджинга, FLIM является неинвазивным с точки зрения безопасности оптического излучения и позволяет проводить наблюдения в динамике, в живых клетках и тканях *in vivo* на разных уровнях – от (суб)клеточного до целого организма. Однако FLIM имеет преимущества перед традиционными методами флуоресцентной визуализации на основе интенсивности. Время жизни флуоресценции является собственной характеристикой флуорофора, которая определяется его химической структурой и локальным окружением и в определенной степени не зависит от концентрации [19]. Так что FLIM является количественным по своей сути и минимизирует артефакты, связанные с неоднородным распределением флуорофора в образце, рассеянием и поглощением света, фокусировкой, различиями в конфигурациях оптических систем, геометрией самого объекта, что особенно ценно при работе с тканями [20]. Опция временного разрешения расширяет возможности флуоресцентных методов от простого наблюдения за локализацией флуорофора или радиометрических измерений до количественного охарактеризования молекулярного окружения флуорофора.

Высокая чувствительность и молекулярная специфичность FLIM сделали возможным анализ энергетического метаболизма клеток путем регистрации эндогенной флуоресценции кофакторов ферментов дегидрогеназ - восстановленного никотинамиддинуклеотида (фосфата) НАД(Ф)Н и окисленных флавинадениндинуклеотида ФАД и флавинмононуклеотида ФМН [21, 22, А8]. Из них, связь кинетики флуоресценции НАД(Ф)Н с процессами клеточного дыхания охарактеризована наиболее полно. Две формы этого кофактора – свободная и связанная с белками - могут быть идентифицированы по времени жизни флуоресценции. В типичном случае, в раковых клетках вклад свободной формы НАД(Ф)Н в затухание флуоресценции коррелирует с интенсивностью гликолиза, а вклад связанной формы – с уровнем митохондриального дыхания. Разработка ряда новых генетически кодируемых и синтетических сенсоров, работающих в красной области спектра, открыла перспективу одновременного наблюдения НАД(Ф)Н и других функциональных показателей [23].

До недавнего времени подходы к применению FLIM для изучения онкологических процессов были слабо развиты. Примеры применения FLIM, в том числе с использованием эндогенной флуоресценции клеток, ограничивались в основном экспериментами на монослойных клеточных культурах. Так что актуальной задачей современной биофизики является разработка подходов к использованию FLIM в многоклеточных моделях *in vitro* и опухолях *in vivo* и трансляция этих разработок в клинику.

Данная работа посвящена разработке подходов к применению FLIM в экспериментальной онкологии и изучению с его помощью энергетического

метаболизма опухолевых клеток при естественном росте и противоопухолевой терапии.

Степень разработанности темы исследования

Сложная биологическая природа опухолей, которая предполагает влияние не только (эпи)генетических факторов, но и взаимодействие опухоли с организмом хозяина, существование опухолевых клеток в условиях гетерогенного микроокружения и фенотипическую пластичность, делает проблему изучения рака – одной из самых сложных в биологии, а проблему лечения - одной из самых сложных в медицине. Во многом понимание природы рака усложняется тем, что подавляющее большинство исследований проводится на чрезмерно упрощенных моделях – культурах опухолевых клеток животных и человека *in vitro*, отдельных выделенных из клеток и тканей компонентах. Тогда как информация о пространственной организации опухоли, ее гетерогенности, влиянии микроокружения на опухолевые клетки, динамике биологических процессов полностью теряется. В изучении биологических, в том числе метаболических, свойств опухолей принципиальную важность имеют два момента: 1) использование опухолевых моделей, которые в наибольшей степени отражают свойства опухолей человека; 2) проведение исследований прижизненными, неинвазивными методами без влияния на физиологическое состояние клеток и тканей. Однако проведению исследований *in vivo* препятствует отсутствие неинвазивных селективных методов, позволяющих наблюдать и количественно оценить отдельные функциональные показатели опухолевой ткани в динамике.

На протяжении последних нескольких десятилетий неуклонно растет интерес к теме опухолевого метаболизма. За последние 20 лет количество научных публикаций в этой области выросло в 2 раза (с 31600 до 72700 по данным PubMed). Благодаря современным высокоинформативным омикс-технологиям, аналитическим, биохимическим, иммуногистохимическим методам и широкому внедрению в клинику методов метаболической визуализации, таких как позитронно-эмиссионная томография с ^{18}F -ФДГ, ^1H -магнитно-резонансная спектроскопия, достигнуто серьезное понимание особенностей биоэнергетики рака [24, 25]. Идентифицированы изменения в клеточном дыхании, отличающие опухоли от нормальных тканей, установлена их связь с генетическими нарушениями и сигнальными путями. Укрепилось мнение, что опухолевый метаболизм – это крайне переменчивая система. В зависимости от текущих потребностей и условий микроокружения (в первую очередь, количества питательных веществ и кислорода) раковые клетки способны активировать различные пути получения энергии – бескислородное расщепление глюкозы (гликолиз) или аэробное дыхание. Кроме того, раковые клетки находятся под постоянным влиянием других типов клеток в опухолевом микроокружении (эндотелиальных клеток, фибробластов и иммунных клеток) и внеклеточного

матрикса. Однако вопросы пластичности и гетерогенности энергетического метаболизма опухолей, особенно на клеточном уровне, - одни из наименее изученных в этой области.

Все большую популярность в биомедицинских исследованиях в последние годы приобретают методы флуоресцентного имиджинга с временным разрешением FLIM. Приложения FLIM в экспериментальной онкологии можно условно разделить на три группы: 1) «метаболический» имиджинг с использованием эндогенной флуоресценции кофакторов дегидрогеназ, восстановленного НАД(Ф)Н и окисленных флавинов ФАД и ФМН, 2) изучение молекулярных взаимодействий с помощью Фостеровской резонансной передачи энергии FRET, 3) зондирование физико-химических параметров с помощью синтетических или генетически кодируемых сенсоров [21-23, 26, 27]. Среди них, «метаболический» FLIM является, пожалуй, наиболее распространенным приложением. В основном, он реализуется в виде двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии с опцией временного разрешения флуоресценции. Примеры исследований с применением FLIM НАД(Ф)Н и ФАД до недавнего времени ограничивались работами на клеточных культурах и несколькими работами *in vivo* [28-30]. За последние пять лет появились работы, выполненные на органотипичных опухолевых культурах (органоидах) и операционных образцах тканей пациентов [31-34]. Принимая во внимание преимущества метода FLIM перед другими методами изучения энергетического метаболизма, мы ставили одной из задач проведение исследований на сложных моделях опухолевого роста и образцах опухолевой ткани.

В настоящее время идет активная работа в химии и генной инженерии по созданию новых сенсоров с чувствительным временем жизни люминесценции и улучшенными спектральными характеристиками для биологических приложений [35]. По сравнению с сенсорами на основе интенсивности, главное преимущество сенсоров на основе времени жизни состоит в возможности более точной количественной оценки изучаемого параметра. Особый интерес для исследований на многоклеточных моделях и тканях представляют сенсоры, работающие в красной области спектра. Среди флуоресцентных сенсоров доступны сенсоры рН, мембранного потенциала, активных форм кислорода и азота, редокс-статуса, вязкости, температуры, содержания различных ионов, активности протеаз, фаз клеточного цикла и др. [36-39]. Фосфоресцентные сенсоры проявляют чувствительность преимущественно к кислороду [40]. Лишь единичные работы демонстрируют примеры мультипараметрического имиджинга с одновременным наблюдением флуоресценции НАД(Ф)Н и/или ФАД и какого-либо другого физиологического параметра(ов) [41-44]. Хотя очевидно, что только комплексное исследование метаболического состояния клетки в комбинации с другими индикаторами ее функциональной активности или состояния микроокружения может дать наиболее полное представление о метаболических аспектах канцерогенеза.

Цель и задачи исследования

Цель диссертационной работы заключалась в комплексном изучении энергетического метаболизма опухолевых клеток и тканей в условиях естественного роста и при противоопухолевой терапии с помощью мультипараметрических подходов на основе FLIM.

Для достижения цели работы были поставлены и реализованы следующие **задачи**:

1. Разработать методики флуоресцентного время-разрешенного имиджинга FLIM окислительно-восстановительных кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в сложных моделях – сфероидах и опухолях животных *in vivo* – и образцах опухолевой ткани *ex vivo*, а также методики мультипараметрического имиджинга на основе регистрации флуоресценции НАД(Ф)Н одновременно с флуоресценцией генетически кодируемых сенсоров или фосфоресценцией кислород-чувствительных красителей.

2. Исследовать особенности энергетического метаболизма опухолей в условиях естественного роста с помощью FLIM. Оценить возможность наблюдения метаболической гетерогенности на клеточном уровне и ее связь с морфофункциональными характеристиками опухолей. Продемонстрировать влияние пролиферативной активности и опухолевого микроокружения на энергетический метаболизм опухолевых клеток.

3. Изучить метаболические изменения при апоптозе опухолевых клеток с использованием автофлуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД и генетически кодируемого сенсора активности каспазы-3. Установить корреляции параметров затухания флуоресценции НАД(Ф)Н, активности каспазы-3 и внутриклеточного уровня АФК.

4. Изучить изменения кинетики флуоресценции НАД(Ф)Н в опухолевых клетках в моделях *in vitro* и *in vivo* при химиотерапии препаратами различных классов. Оценить возможность применения FLIM для анализа химиочувствительности опухолевых клеток, выделенных из опухолей пациентов. Исследовать ответ опухолевых клеток на ФДТ с химическим и генетически кодируемым фотосенсибилизаторами с помощью FLIM НАД(Ф)Н.

5. Оценить связь энергетического метаболизма и кислородного статуса опухолей *in vivo* при естественном росте, химиотерапии и ФДТ, используя FLIM НАД(Ф)Н и PLIM с фосфоресцентными сенсорами молекулярного кислорода.

6. Исследовать связь физико-химических показателей опухолевых клеток – pH цитозоля и микровязкости цитоплазматической мембраны - с метаболическим состоянием опухолевых клеток.

Объект и предмет исследования

Объектами исследования служили культивируемые опухолевые клетки, опухолевые модели у лабораторных животных, в том числе экспрессирующие генетически кодируемые флуоресцентные белки, операционные образцы опухолей пациентов. Основным предметом исследования были показатели метаболического статуса в живых клетках и тканях, регистрируемые с помощью методов FLIM по автофлуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД.

Научная новизна работы

Для изучения особенностей биоэнергетики опухолевых клеток в диссертационной работе использованы новейшие технологии флуоресцентной и фосфоресцентной визуализации с временным разрешением (FLIM и PLIM), автофлуоресценция собственных компонентов тканей, флуоресцентные генетически кодируемые белки, в том числе новые сенсоры, химические сенсоры. С использованием двухфотонной флуоресцентной микроскопии с временным разрешением и новых флуоресцентных время-разрешенных методов - оптоволоконной спектроскопии и конфокального макроимиджинга, разработан ряд оригинальных методик и протоколов оценки метаболизма опухолей на разном уровне – от клеточного до целой опухоли. Разработаны принципы мультипараметрических исследований на основе комбинации автофлуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД и флуоресценции красных флуоресцентных белков – сенсоров pH, апоптоза, фаз клеточного цикла, а также фосфоресцентных сенсоров молекулярного кислорода.

Впервые выполнено сравнительное исследование метаболической гетерогенности на клеточном уровне в опухолевых сфероидах, опухолях мышей *in vivo*, образцах опухолей пациентов *ex vivo* и выделенных из них клетках с помощью FLIM НАД(Ф)Н. Продемонстрировано, что на процессы клеточного дыхания оказывают влияние множество факторов, так что гетерогенность может быть обусловлена различной пролиферативной активностью опухолевых клеток, их взаимодействием с фибробластами, присутствием коллагена, распределением кислорода в опухолевом микроокружении.

Впервые на основе количественной оценки относительной фракции свободной формы НАД(Ф)Н в образцах колоректального рака пациентов установлена связь внутриопухолевой клеточной метаболической гетерогенности со степенью злокачественности опухоли.

Впервые показана возможность дифференцирования глиобластомы от белого вещества мозга по показателям затухания флуоресценции в спектральном канале НАД(Ф)Н с помощью FLIM-макроимиджинга, что позволяет рассматривать этот метод как новый способ оптической экспресс-биопсии.

Впервые установлено, что химиотерапия различными препаратами вызывает схожие изменения параметров времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н в опухолевых клетках *in vitro* и *in vivo*, указывающие на изменение баланса энергетического обмена в сторону окисления. Данные изменения были связаны со снижением пролиферации и наблюдались независимо от индукции апоптоза. Предложены новые подходы к оценке химиочувствительности опухолевых клеток, выделенных из материала опухоли пациентов, на основе FLIM-микроскопии НАД(Ф)Н. При исследовании метаболических изменений в процессе апоптотической гибели продемонстрированы связи активности каспазы-3 и активации окислительного фосфорилирования с уровнем активных форм кислорода в клетках. Впервые с помощью FLIM зарегистрирована фосфорилированная форма НАДН - НАДФН - в опухолевых клетках при индуцированном апоптозе.

Впервые с помощью FLIM НАД(Ф)Н исследованы изменения в энергетическом метаболизме опухолевых клеток при ФДТ с «клеточным» и преимущественно сосудистым механизмами действия. Предложены методики и показана возможность индукции фототоксических эффектов в модели опухолевых сфероидов и опухолях мышей с использованием генетически кодируемого фотосенсибилизатора KillerRed. Показано, что ФДТ может вызывать разнонаправленные изменения в показателях затухания флуоресценции НАД(Ф)Н на фоне развития гипоксии в зависимости от уровня кислорода в клетках.

Путем одновременного анализа кинетик флуоресценции НАД(Ф)Н и фосфоресценции кислородных сенсоров в опухолях *in vivo* методами FLIM и PLIM впервые показана умеренная связь состояния биоэнергетики клеток с содержанием кислорода на клеточном уровне и зарегистрировано разобщение кислородной регуляции клеточного дыхания при химиотерапии и ФДТ.

Впервые исследована роль внутриклеточного pH и микровязкости мембран в регуляции энергетического метаболизма опухолевых клеток. Показана возможность измерения внутриклеточного pH с помощью нового генетически кодируемого сенсора SypHerRed и FLIM. Впервые получены абсолютные значения pH в опухолях *in vivo* с помощью FLIM. Показана возможность одновременной визуализации флуоресценции сенсора SypHerRed и кофактора НАД(Ф)Н. Впервые показано, что изменения pH цитозоля в опухолевых клетках могут быть как следствием перестроек в клеточном дыхании, так и развиваться независимо от них, например, при химиотерапии. При исследовании микровязкости впервые показано, что в условиях естественного роста микровязкость плазматической мембраны имеет стабильное значение, характерное для данного типа клеток, и не зависит от их пролиферативной и метаболической активности.

Новизна результатов диссертационного исследования отражена в научных публикациях в передовых международных изданиях и подтверждена патентами на изобретения РФ:

1. Способ фотодинамической терапии опухолей / Патент на изобретение № RU 2519936. Авторы: **Ширманова М.В.**, Загайнова Е.В., Лукьянов С.А., Серебровская Е.О., Снопова Л.Б., Бугрова М.Л., Турчин И.В., Сироткина М.А., Каменский В.А. (2014 г.)

2. Способ регистрации внутриклеточного рН опухолевых клеток / Патент на изобретение № RU 2565377. Авторы: **Ширманова М.В.**, Дружкова И.Н., Лукина М.М., Загайнова Е.В., Лукьянов С.А., Белоусов В.В., Матдашов М.Е., Снопова Л.Б. (2014 г.)

3. Порфиразин, порфиразиновый комплекс гадолиния и их применение / Патент на изобретение № RU 2621710. Клапшина Л.Г., Лермонтова С.А., Пескова Н.Н., Балалаева И.В., Шилягина Н.Ю., **Ширманова М.В.**, Гаврина А.И., Южакова Д.В. (2016 г.).

Теоретическая и практическая значимость работы

С фундаментальной точки зрения, результаты данной работы расширяют существующие представления об опухолевом метаболизме. Выполненные на живых опухолевых клетках и опухолях *in vivo* исследования методом FLIM привнесли новые данные о внутриопухолевой гетерогенности энергетического метаболизма на клеточном уровне, роли различных факторов, относящихся к самим клеткам и их микроокружению, в формировании метаболического фенотипа. Получены экспериментальные подтверждения выраженной метаболической гетерогенности опухолей пациентов, выполнена ее количественная оценка. Выявлены изменения в клеточном энергетическом метаболизме, сопровождающие ответ опухолевых клеток на химиотерапию и ФДТ препаратами различного механизма действия, изучена их связь с внутриклеточным содержанием кислорода. Отдельно исследованы метаболические реакции при развитии апоптоза в динамике, установлена последовательность клеточных событий и корреляция метаболических показателей с уровнем активных форм кислорода (АФК). С помощью новых флуоресцентных сенсоров исследованы *in vitro* и *in vivo* и количественно охарактеризованы физико-химические показатели опухолевых клеток – рН цитозоля и микровязкость мембраны, исследована их связь с метаболическим статусом.

С практической точки зрения, разработанные нами подходы к оценке энергетического метаболизма опухолей на клеточном и макро-уровне с помощью FLIM предоставляют методологическую базу для разработки новых способов клинической интраоперационной диагностики опухолей и прогнозирования эффективности терапии. В качестве метода диагностики (экспресс-биопсии) наиболее релевантным нам кажется флуоресцентный время-разрешенный макроимиджинг, позволяющий быстро получать информацию о метаболических или биохимических параметрах довольно

крупных образцов тканей. Нарботки по части оптоволоконной время-разрешенной спектроскопии НАД(Ф)Н представляют интерес для развития FLIM-эндоскопии и волоконных систем для зондирования операционного поля. В качестве прогностического критерия представляется перспективной оценка уровня метаболической гетерогенности на клеточном уровне. Разработанные нами методики анализа ответа первичных опухолевых культур на химиотерапию с помощью FLIM НАД(Ф)Н могут быть использованы для индивидуального подбора лекарственных препаратов и скрининга новых потенциальных противоопухолевых агентов.

Результаты исследований используются в специальных дисциплинах «Биология и моделирование опухолевого роста» и «Флуоресцентный имиджинг и его приложения» в магистратуре ПИМУ и могут быть включены в соответствующие разделы лекций общего курса по биофизике, медицинской физике, биохимии и физиологии человека и животных.

Методология и методы исследования

Результаты диссертационного исследования получены с использованием современных инструментальных методов, как традиционных, так и оригинальных, разработанных при участии автора. Исследования базировались на методах флуоресцентного и фосфоресцентного время-разрешенного имиджинга (FLIM, PLIM) на основе время-коррелированного счета одиночных фотонов (TCSPC) – двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии с опциями FLIM и PLIM, однофотонного флуоресцентного и фосфоресцентного время-разрешенного макроимиджинга (макро-FLIM, макро-PLIM) и оптоволоконной люминесцентной спектроскопии с временным разрешением. В качестве флуорофоров использованы метаболические кофакторы дегидрогеназ НАД(Ф)Н и ФАД и флуоресцентные сенсоры – генетически кодируемый сенсор каспазы-3 mKate2-DEVD-iRFP, генетически кодируемый сенсор клеточного цикла FUCCI-Red, генетически кодируемые сенсоры pH SypHer1, SypHer2, SypHer-Red, сенсор вязкости BODIPY2. Для ФДТ использованы генетически кодируемые фотосенсибилизаторы KillerRed и miniSOG и фотодитазин. В исследованиях кислорода использованы фосфоресцентные сенсоры BTPDM1, NanO2, PIr3. В работе использовались стандартные методы клеточного культивирования, техники работы с лабораторными животными, методы подкожной и интракраниальной прививки опухолей. Химиотерапия проводилась препаратами, входящими в клинические протоколы (цисплатин, оксалиплатин, 5-фторурацил, иринотекан, таксол, темодал). Для верификации терапевтических эффектов применялись общепринятые методы оценки жизнеспособности клеток, патоморфологический анализ опухолевой ткани, иммуногистохимия. Для подтверждения результатов FLIM использовались методы биохимического и молекулярного анализа и время-пролетной масс-спектроскопии ToF-SIMS.

Личный вклад автора

Автор лично ставил цели и задачи исследования, проводил анализ мировой литературы, планировал эксперименты и участвовал в их проведении, обрабатывал и интерпретировал результаты, представлял результаты на научных конференциях, участвовал в подготовке публикаций по теме диссертационного исследования. Основные результаты получены лично автором, либо под его непосредственным руководством.

Представленные исследования проводились в рамках ряда грантов, в которых автор диссертации выступал руководителем или основным исполнителем, включая: РФФИ № 15-32-20324 «Исследование метаболического и кислородного статуса опухолей *in vivo* с использованием время-разрешенного имиджинга» (2015-2016 гг, рук.), РФФИ №18-29-01022-мк «Оптимизированная иммунотерапия экспериментальной глиобластомы с помощью модифицированных НК-клеток человека с оценкой метаболического ответа опухоли и биOLUMИнесцентной детекцией эффективности лечения» (2018-2021 гг., рук.), РФФИ №17-00-00193-КОМФИ «Исследование роли опухоль-ассоциированных фибробластов в опухолевой инвазии: возможное поле для противоопухолевой терапии» (2017-2020 гг., рук.), РФФИ № 15-02-05189 «Разработка метода измерения вязкости опухолевых клеток *in vivo* с помощью флуоресцентных молекулярных роторов различной природы и их солибилизованных форм» (2015-2017 гг, рук.), РФФИ № 20-14-00111 "Исследование микровязкости мембран опухолевых клеток с помощью молекулярных роторов и флуоресцентной время-разрешенной микроскопии и ее роли в ответе на противоопухолевую терапию" (2020-2022 гг., продление 2023-2024, рук.), РФФИ № 20-65-46018 "Разработка технологий диагностики и прогнозирования эффективности терапии онкологических заболеваний на основе флуоресцентной микроскопии с временным разрешением" (2020-2022 гг., отв. исп.), РФФИ № 23-65-10005 «Разработка метода прямого детектирования люминесценции синглетного кислорода в фотосенсибилизированных раковых клетках на основе однофотонного сверхпроводникового детектора и время-коррелированного счета одиночных фотонов» (2023-2026 г, отв. исп.), госзадание Минздрава РФ «Создание тест-системы для определения индивидуальной лекарственной чувствительности опухоли пациентов» (2020-2022 г, рук.).

Под руководством автора в рамках темы диссертационной работы подготовлены и защищены 9 дипломных работ специалистов, бакалавров и магистров, 2 кандидатских диссертации. Работа по теме диссертации проводилась в сотрудничестве с МГУ им. М.В. Ломоносова, Санкт-Петербургским государственным университетом, Институтом металлоорганической химии РАН, Институтом биоорганической химии РАН, Московским государственным педагогическим университетом, Институтом химической физики РАН, компанией Becker&Hickl GmbH (Германия), Федеральным научно-клиническим центром ФМБА России, Приволжским

окружным медицинским центром ФМБА России, Нижегородским областным клиническим онкологическим диспансером.

Результаты работы автора отмечены наградами различного уровня, в том числе: почетной грамотой НижГМА (ныне ПИМУ) за многолетний добросовестный труд, высокий профессионализм, активную научную работу (2015 г), почетной грамотой Министерства образования Нижегородской области за достигнутые результаты в развитии научно-образовательного комплекса Нижегородской области и связи с Днем российской науки (2018 г.), **Премией Президента Российской Федерации в области науки и инноваций для молодых ученых за 2019 год**, благодарностью администрации ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России за многолетний добросовестный труд и профессионализм (2023 г).

Положения, выносимые на защиту:

1. Предложенные в работе методики флуоресцентного время-разрешенного имиджинга FLIM автофлуоресценции кофактора НАД(Ф)Н позволяют прижизненно оценивать баланс между гликолизом и аэробным дыханием в клеточных культурах, опухолевых сфероидах, опухолях животных *in vivo*. Одновременная визуализация автофлуоресценции НАД(Ф)Н с флуоресценцией красных генетически кодируемых белков-сенсоров рН, апоптоза, фаз клеточного цикла или фосфоресценцией кислородных сенсоров в одних и тех же клетках или опухолях дает возможность проводить мультипараметрические исследования.

2. FLIM-микроскопия НАД(Ф)Н является уникальным методом визуализации метаболической гетерогенности опухолей на клеточном уровне. Межклеточная гетерогенность энергетического обмена в опухолях обусловлена различной пролиферативной активностью клеток и факторами микроокружения, включая взаимодействие с фибробластами, наличие коллагена и гипоксию. Колоректальный рак метаболически более гетерогенен по сравнению с нормальным эпителием кишечника, а низко-дифференцированные опухоли метаболически более гетерогенны по сравнению с умеренно- и высоко-дифференцированными.

3. Макро-FLIM в спектральном канале НАД(Ф)Н позволяет дифференцировать глиобластому от белого вещества мозга. Опухоли отличаются от белого вещества более коротким средне-взвешенным временем жизни флуоресценции.

4. Увеличение относительной фракции связанного с белком НАД(Ф)Н, ассоциированного с аэробным дыханием, в опухолевых клетках является индикатором ответа на химиотерапию и фотодинамическую терапию. Эти изменения наблюдаются в жизнеспособных клетках и связаны со снижением их пролиферативной активности.

Достоверность и апробация результатов

Достоверность результатов обеспечена использованием достаточного количества экспериментального материала, применением надежного и апробированного оборудования, адекватных методов получения и обработки данных и статистического анализа, воспроизводимостью результатов исследований. Результаты дополняют и расширяют представления, полученные в работах других групп. Достоверность результатов подкреплена публикациями в международных рецензируемых журналах высокого уровня цитируемости. По теме диссертации за последние 10 лет опубликовано 59 научных статей в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus и имеющих рейтинг Q1, Q2 (44), RSCI (14) и входящих в перечень журналов, рекомендованных ВАК, К-1, К-2 (1). Из них 40 статей в журналах первого квартиля (Q1). Опубликовано 6 глав в зарубежных монографиях.

Результаты работы были представлены в виде докладов более чем на 40 международных и всероссийских конференциях. Из них 30 докладов имели статус приглашенных, которые были представлены на следующих научных мероприятиях: международный семинар “Advanced Multiphoton and Fluorescence Lifetime Imaging Techniques” (Заарбрюкен, Германия, 2013; Берлин, Германия, 2017), международный симпозиум “Topical Problems of Biophotonics TPB” (Нижний Новгород, Санкт-Петербург, Россия, 2013, 2015, 2017, 2019, 2022), научно-практическая конференция “Life Science Imaging” (Нижний Новгород, 2014), международная конференция “Laser Applications in Life Sciences (LALS)” (Мюнхен, Германия, 2014), школа-конференция «Методы гистологического исследования и визуализации» (Санкт-Петербург, Россия, 2017), международный семинар “Advanced TCSPC Techniques in Biomedical Sciences” (Бесезда, США, 2016), международная школа-конференция “Современные методы флуоресцентного имиджинга ADFLIM” (Москва, Россия, 2016), международная конференция “European Conferences on Biomedical Optics (ECBO)” (Мюнхен, Германия, 2017), IV Российский конгресс с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» (Санкт-Петербург, Россия, 2017), международный семинар “Advanced Optical Methods Workshop” (Шеньжень, Китай, 2018), практический семинар “LASERLAB EUROPE, Time-Resolved Techniques” (Вестек, Чехия, 2018), международная конференция “SPIE Photonics West” (Сан-Франциско, США, 2018, 2020, 2021), международный семинар “Advanced Imaging Methods” (Беркли, США, 2018, 2020, 2021, 2022), международный конгресс “OSA Biophotonics Congress: Optics in the Life Sciences” (Туксон, США, 2019), международный семинар “Advanced Optical Microscopes” (Аргентина, 2019), междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Нижний Новгород, Россия, 2020), международная конференция “Towards optical and multimodality translational imaging TOMTI'20” (Саратов, Россия, 2020), международная конференция “Laser

Optics ICLO” (Санкт-Петербург, 2020; Россия, 2022), международная конференция “Advanced Laser Technologies” (ALT21, Москва, 2021; ALT23 Самара, 2023), международная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (Суздаль, 2023), международный семинар «Current Trends in Biophotonics» (Нижний Новгород, 2023), V международная конференция «Физика — наукам о жизни» (Санкт-Петербург, 2023).

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДОКЛАДА

2.1 Основы оптического метаболического имиджинга

В основе оптического метаболического имиджинга лежит регистрация собственной флуоресценции клеток и тканей в сине-зеленой области спектра, продуцируемой кофакторами дегидрогеназ - пиридин-нуклеотидами НАДН и НАДФН (суммарно обозначаемые как НАД(Ф)Н) и флавиновыми нуклеотидами ФАД и ФМН (рис. 1).

НАДН участвует в качестве донора электронов в составе редокс-пары НАД⁺/НАДН во многих биохимических реакциях, в том числе в энергетическом метаболизме клетки [45]. Восстановленная форма НАДН образуется в процессе гликолиза и в цикле Кребса (цикл трикарбоновых кислот) и включается в процесс окислительного фосфорилирования, где происходит перенос электронов и протонов с НАДН в электрон-транспортную цепь митохондрий. Электроны и протоны от НАДН через комплексы дыхательной цепи транспортируются на кислород, при этом НАДН на уровне I комплекса окисляется до НАД⁺, а протоны поступают из матрикса митохондрий в межмембранное пространство, что приводит к созданию электрохимического потенциала, энергия которого используется для синтеза АТФ. Фосфорилированная форма НАДН (НАДФН) участвует в реакциях биосинтеза дезоксирибонуклеотидов и жирных кислот, образовании АФК в составе НАДФН-оксидазы и их детоксикации через восстановление глутантиона. В типичном случае, концентрация НАДФН в клетке в десятки раз ниже, чем НАДН, поэтому вклад НАДФН во флуоресценцию НАДН во внимание не принимается. Спектр возбуждения НАД(Ф)Н лежит в районе 300–400 нм с пиком на длине волны 355 нм, спектр эмиссии — в районе 400–600 нм с максимумом на 470 нм [46]. Окисленные формы этого кофактора НАД⁺ и НАДФ⁺ флуоресценцией не обладают.

Флуоресценция флавинов содержит в себе три главных компонента: окисленный флавинадениндинуклеотид ФАД, окисленный флавиномононуклеотид ФМН, рибофлавин (предшественник флавиновых кофакторов) [47]. Среди флавинов окисленный ФАД является основным источником флуоресценции в клетках, концентрация ФМН обычно в 3-5 раз ниже, а рибофлавина в 40-400 раз ниже, чем ФАД [48, 49]. Основной источник ФАДН₂ у эукариот — цикл Кребса и β-окисление липидов. В цикле Кребса ФАД является простетической группой фермента сукцинатдегидрогеназы, которая окисляет сукцинат до фумарата с образованием ФАДН₂. В β-окислении липидов ФАД является коферментом ацетил-СоА дегидрогеназы. ФАДН₂ используется как субстрат в окислительном фосфорилировании в митохондриях, где окисляется до ФАД (рис. 1). У окисленных флавинов спектр возбуждения флуоресценции находится в диапазоне 350–500 нм с двумя максимумами — на 370 и 450 нм, спектр эмиссии — в диапазоне 500–600 нм с максимумом на 525 нм [47].

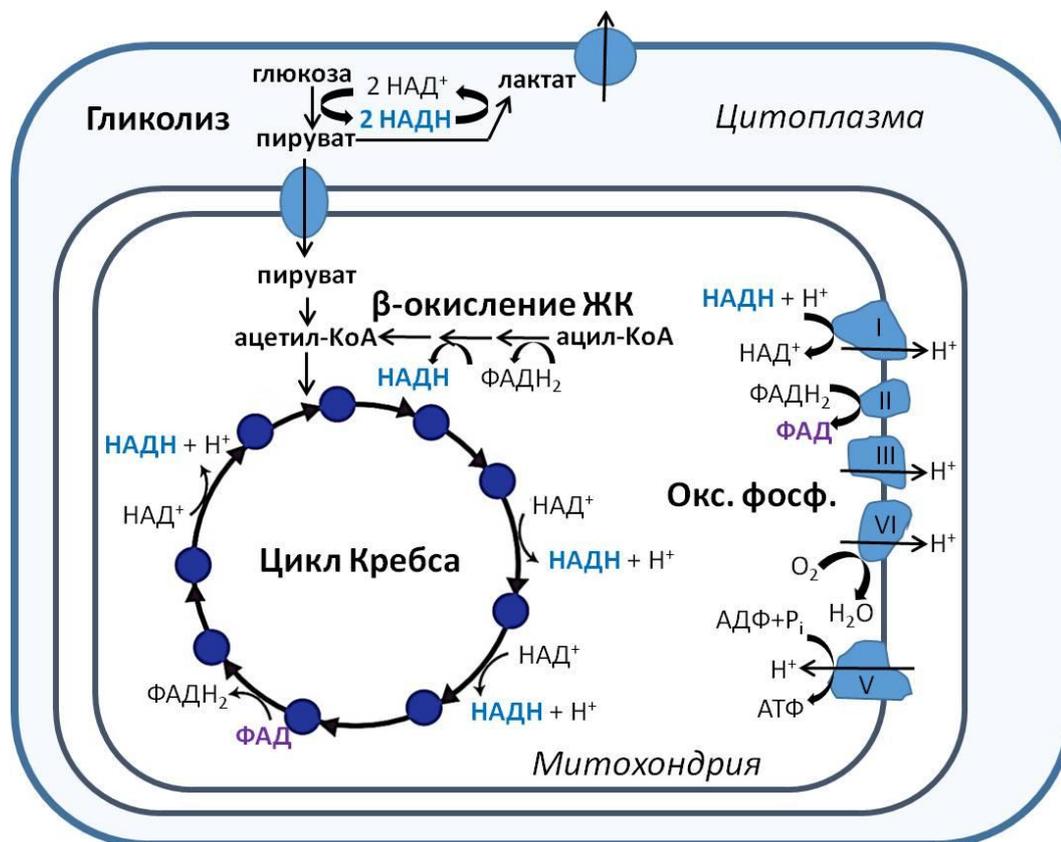


Рисунок 1. Схема основных процессов энергетического метаболизма клетки с участием НАДН и ФАД. Заимствовано из [50], модифицировано и дополнено.

Существует два основных подхода к анализу энергетического метаболизма на основе флуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД:

1) анализ редокс-отношения – отношения интенсивностей флуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД. Так как НАД(Ф)Н и ФАД - единственные переносчики электронов, которые способны к флуоресценции, соотношение интенсивностей их флуоресценции может служить для оценки редокс-состояния клеток. Этот подход был впервые предложен американским биохимиком Бритоном Чансом в 1970-х гг. [51] и используется до сих пор. Оптическое редокс-отношение фактически является аналогом биохимического отношения $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ [52]. Редокс-отношение $\text{ФАД}/\text{НАД(Ф)Н}$ чувствительно к балансу между скоростью потребления АТФ и катаболизмом глюкозы в клетке. В отсутствие пропорционального окисления НАДН до НАД^+ в электрон-транспортной цепи митохондрий, НАДН накапливается, и редокс-отношение снижается. Оценка редокс-отношения проста в реализации и подходит для оценки редокс-статуса выделенных митохондрий и клеточных культур. Однако для тканей его применение затруднительно из-за артефактов, связанных с рассеянием и поглощением света и сложной архитектурой ткани.

2) анализ времени жизни флуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД. Время жизни флуоресценции индивидуально для каждого флуорофора и в значительной степени зависит от его молекулярного окружения, но не от концентрации. В случае кофакторов время жизни флуоресценции зависит от

их взаимодействия с белками. НАД(Ф)Н присутствует в клетке в двух состояниях – свободном и связанном с белками. Свободная форма НАД(Ф)Н имеет характерное время жизни флуоресценции порядка 0.3-0.5 нс и ассоциирована с гликолизом, тогда как связанная форма имеет время жизни 1.5-3.5 нс и ассоциирована в основном с митохондриальным дыханием [53]. Время жизни флуоресценции белок-связанной формы НАД(Ф)Н зависит от того, с каким белком связан кофактор [54]. Традиционно затухание флуоресценции НАД(Ф)Н описывается би-экспоненциальной функцией $I = a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2}$, где короткая компонента τ_1 соответствует свободной форме, а длинная τ_2 – связанной форме кофактора. При этом относительные амплитуды ($a_1 \sim 80\%$ и $a_2 \sim 20\%$) отражают относительное содержание каждой из форм. В типичном случае, если другие метаболические пути не оказывают существенного влияния, изменение в соотношении относительных вкладов свободной и связанной форм a_1 и a_2 наблюдается вследствие изменения баланса между гликолизом и окислительным фосфорилированием [52]. Снижение среднего времени жизни τ_m ($(a_1\tau_1 + a_2\tau_2)/(a_1 + a_2)$) за счет роста величины a_1 - вклад свободной формы - может указывать как на повышение активности гликолиза, так и на снижение интенсивности митохондриального дыхания. Невозможность точного определения причины изменения вкладов a_1 и a_2 является, пожалуй, самым серьезным ограничением данного подхода.

Корреляции редокс-отношения и параметров затухания флуоресценции τ_m , a_1 или a_2 НАД(Ф)Н и со стандартными биохимическими показателями энергетического метаболизма клетки (поглощение глюкозы, выделение лактата, дыхательная активность) надежно установлены в работах других авторов [55-57] и наших предварительных экспериментах (рис. 2).

В случае ФАД время жизни флуоресценции определяется конформацией молекулы и составляет $\sim 0.3-0.4$ нс для закрытой (τ_1) и $\sim 2.5-2.8$ нс для открытой конформации (τ_2) [58]. Интерпретация кинетики флуоресценции ФАД, однако, сложна из-за того, что ФМН и рибофлавин тоже могут вносить вклад, а сам ФАД участвует во многих процессах, помимо энергетического метаболизма, включая окисление глутатиона, липогенез, антиоксидантные реакции, синтез ацетил-КоА, аскорбат-глутатионовый цикл. Очень часто в опухолевых клетках и тканях флуоресценция ФАД имеет слабую интенсивность, что затрудняет сбор фотонов для построения кривых затухания за адекватное время без фотоповреждения образца.

Поэтому в своей работе по изучению метаболизма в качестве параметров оценки мы использовали, в основном, время жизни флуоресценции НАД(Ф)Н для всех моделей и, дополнительно, редокс-отношение ФАД/НАД(Ф)Н и реже время жизни ФАД при работе с клеточными культурами.

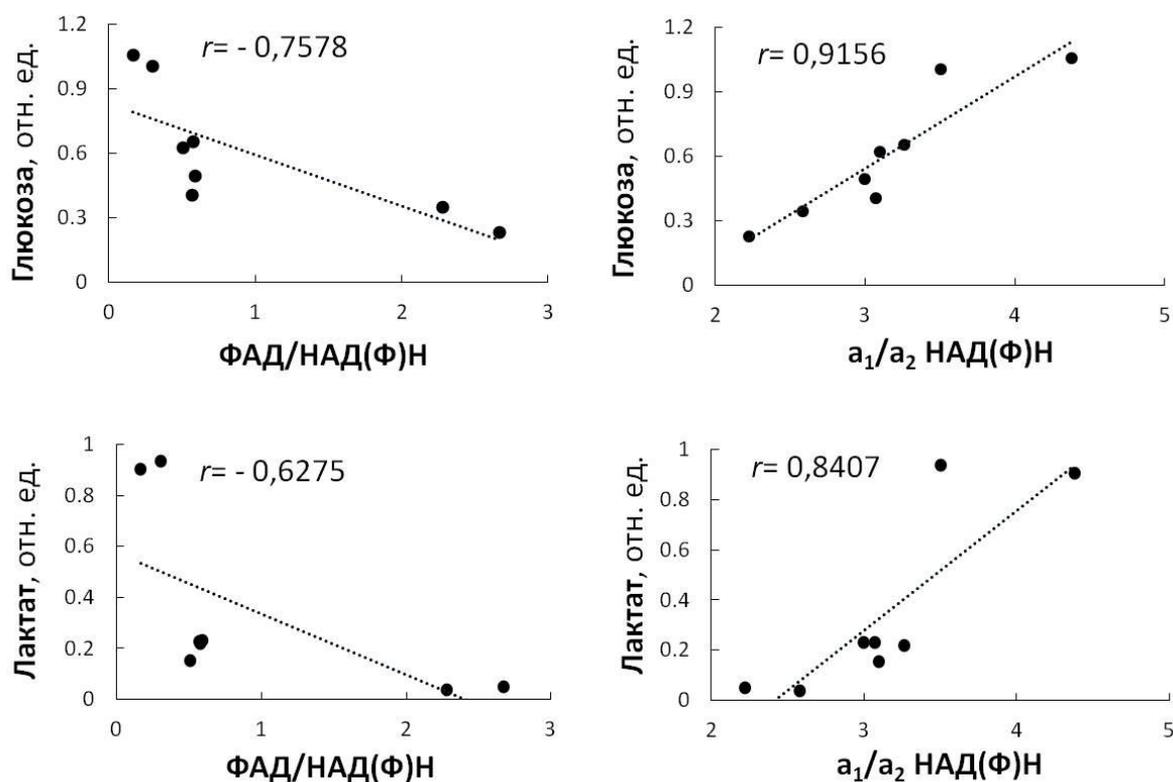


Рисунок 2. Корреляция редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н и вкладов свободной и связанной форм a_1/a_2 НАД(Ф)Н с поглощением глюкозы и продукцией лактата. Коэффициенты корреляции r показаны на диаграммах. Точки – измерения в различных клеточных культурах.

Для получения информации о затухании флуоресценции используются методы флуоресцентного имиджинга с временным разрешением FLIM. Достоинствами методов FLIM для оценки метаболизма являются отсутствие необходимости в использовании экзогенных контрастных агентов (label free), высокая чувствительность, молекулярная специфичность, неинвазивность, быстрый анализ данных на основе изображения. Изображения, полученные с помощью FLIM НАД(Ф)Н и ФАД фактически представляют собой биохимическую «карту» образца, содержащую в себе уникальную молекулярную информацию.

Среди различных способов регистрации фотонов, время-коррелированный счет одиночных фотонов (TCSPC, time-correlated single photon counting) считается наиболее эффективным и обеспечивает наиболее высокое временное разрешение [59]. TCSPC основан на детектировании одиночных фотонов, излучаемых молекулами, при возбуждении периодическими импульсами света, измерении времени детектирования фотонов и последующей реконструкции кривой затухания. Хотя технология TCSPC использовалась для точечных измерений времен затухания флуорофоров с 1970-х гг., принцип получения микроскопических флуоресцентных изображений с временным разрешением, основанный на

TCSPC, был впервые предложен в 1991 г. немецким физиком Вольфгангом Беккером [60].

В настоящее время FLIM на основе TCSPC реализован на базе одно- и двухфотонной флуоресцентной микроскопии, макроимиджинга [A15] и оптоволоконной спектроскопии [A11]. Все три модальности обладают достаточной чувствительностью для регистрации автофлуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД [61]. Возможности макроскопического FLIM и оптоволоконной время-разрешенной спектроскопии для оценки энергетического метаболизма впервые установлены в наших работах и представлены в диссертационном исследовании.

2.2 Методики оценки энергетического метаболизма клеток с помощью FLIM

2.2.1 FLIM-микроскопия НАД(Ф)Н и ФАД, редокс-отношение

Двухфотонная FLIM-микроскопия является на сегодняшний день наиболее распространенным методом исследования клеточного метаболизма в ряду других модальностей FLIM. В области экспериментальной онкологии до наших исследований FLIM на основе автофлуоресценции кофакторов проводился преимущественно на монослойных клеточных культурах. Единичные работы *in vivo* были выполнены на модели индуцированного канцерогенеза на слизистой щеки хомяка [28, 62]. Поэтому необходимым этапом работы была адаптация методик FLIM-микроскопии для работы с конкретными клеточными культурами с учетом особенностей их роста и конфигурации микроскопа и разработка методик для визуализации НАД(Ф)Н в многоклеточных опухолевых сфероидах, классических моделях подкожных опухолей мышей и образцах опухолевой ткани.

Работа проводилась на лазерном сканирующем микроскопе LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) и многофотонном флуоресцентном томографе MPTflex (JenLab, Германия). LSM 880 оснащен перестраиваемым фемтосекундным Ti:Sa лазером Mai-Tai (Spectra Physics, США) с частотой следования импульсов 80 МГц и длительностью 120 фс и FLIM-модулем Simple Tau 152 TCSPC (Becker & Hickl, Германия). На LSM 880 изображения получали с использованием водного иммерсионного объектива C-Apochromat 40x/1.2NA. Возбуждение флуоресценции НАД(Ф)Н в двухфотонном режиме осуществляли на длине волны 750 нм, сигнал принимали в диапазоне 450–490 нм. Мощность возбуждающего излучения ~6 мВт. Время сбора фотонов ~60 с. При необходимости получения редокс-отношения флуоресценцию ФАД возбуждали волны 900 нм, принимали в диапазоне 500-550 нм. Во время экспериментов клетки и сфероиды находились в мини-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂, животные – на термостатируемом столике при 37°C.

Установка MPTflex оснащена перестраиваемым фемтосекундным Ti:Sa лазером Mai-Tai (Spectra Physics, США) с частотой следования импульсов 80 МГц и длительностью 200 фс и FLIM-модулем Simple Tau 150 TCSPC

(Becker & Nickl, Германия). Изображения получены с помощью масляно-иммерсионного объектива EC Plan-Neofluar 40x/1.3 NA. Флуоресценцию НАД(Ф)Н возбуждали на длине волны 750 нм, принимали в диапазоне 410–660 нм (фильтр предустановлен производителем). Мощность возбуждающего излучения ~10 мВт. Время сбора фотонов ~10 с. Настройки подобраны таким образом, чтобы обеспечивать сбор не менее 2000 фотонов в пикселе изображения. При необходимости при построении кривых затухания число фотонов увеличивали до 5000, используя опцию биннирования. Данные FLIM обрабатывали в программе SPImage (Becker & Nickl, Германия).

Кривые затухания флуоресценции НАД(Ф)Н были аппроксимированы би-экспоненциальной моделью. Точность аппроксимации оценивали методом наименьших квадратов посредством параметра χ^2 . Для всех данных χ^2 лежал в диапазоне от 0.8 до 1.2. Из кривых затухания оценивали короткую и длинную компоненты (τ_1 и τ_2 соответственно), относительные амплитуды этих компонент (a_1 и a_2 , $a_1 + a_2 = 100\%$), а также среднее время жизни флуоресценции τ_m .

Микроскопические изображения анализировали поклеточно, выбирая зону цитоплазмы в индивидуальных клетках в качестве области интереса.

Монослойные культуры клеток. Библиотечные клеточные линии культивировали по стандартной методике в полной ростовой среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки FBS, L-глутамина и пенициллина/стрептомицина в CO₂ инкубаторе (37°C, 5% CO₂, 80% влажность). Первичные клеточные культуры выделяли из образцов колоректального рака и глиом пациентов, согласно описанным протоколам [A20, A47]. За 24 ч до микроскопического исследования клетки высевали на культуральные чашки со стеклянным дном FluoroDish для конфокальной микроскопии (диаметр 35 мм) в питательной среде DMEM без фенолового красного. Клеточные культуры колоректального рака высевались на 96-луночные культуральные планшеты с черными стенками для конфокальной микроскопии сразу после выделения клеток из образца. Дно лунок предварительно покрывали коллагеном для лучшей адгезии. FLIM проводили через 72 ч после посева. За 4-6 ч до исследования проводили смену культуральной среды на DMEM без фенолового красного.

Опухолевые сфероиды выращивали в 96-луночных круглодонных неадгезивных планшетах в полной ростовой среде DMEM в CO₂ инкубаторе, как описано в наших работах [A13, 63, 64]. Зрелые сфероиды размером 200-300 мкм аккуратно переносили с помощью дозатора на чашки для конфокальной микроскопии со стеклянным дном, меняя среду на DMEM life без фенолового красного, и инкубировали 30-60 мин для прикрепления сфероидов ко дну чашки. Затем чашку устанавливали на столик микроскопа, находили сфероид в режиме проходящего света, переходили в режим FLIM и получали изображения с глубины ~30 мкм, так чтобы оптический срез проходил через наружную зону пролиферации и центральную зону

покоящихся клеток сфероидов. Анализ метаболизма проводили отдельно в периферической и центральной зонах.

Опухоли животных in vivo. Для получения опухолей мышам прививали опухолевые клетки подкожно на бедро или на ухо по стандартной методике [65]. Непосредственно перед исследованием животное наркотизировали смесью золетила (40 мг/кг, 50 мкл) и 2% рометара 10 мг/кг, 10 мкл). У опухолей на бедрах хирургически открывали кожный лоскут над опухолью в стерильных условиях. Для опухолей, локализованных на ухе, удаление кожи не требовалось. При работе на томографе MPTflex животное размещали на нагревательном столике (37°C), объектив устанавливали на поверхность опухоли, находили фокус в режиме быстрого сканирования и снимали FLIM-изображения НАД(Ф)Н. При работе на LSM 880, животное фиксировали медицинским скотчем на специальном держателе, помещали на столик инвертированного микроскопа так, чтобы опухоль располагалась над объективом, находили область интереса в режиме регистрации интенсивности НАД(Ф)Н и переключались в режим FLIM. Для визуализации волокон коллагена в некоторых экспериментах регистрировали сигнал генерации второй гармоники (ГВГ).

Образцы опухолей пациентов. Получение флуоресцентных изображений НАД(Ф)Н с опухолей пациентов большинства локализаций с помощью FLIM-микроскопии возможно только на изолированных свежих образцах ткани. Наши предварительные исследования показали, что при нахождении образца ткани на воздухе параметры затухания флуоресценции НАД(Ф)Н меняются уже спустя 5 мин после забора материала. В связи с этим, разработка методики анализа энергетического метаболизма клеток *in vivo* образцах опухолей заключалась прежде всего в подборе условий хранения образцов, обеспечивающих максимальное сохранение сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н. На образцах опухолей мышей различного гистогенеза (колоректальный рак мышцы СТ26, меланома В16, карцинома легкого Льюис LLC) было апробировано 7 вариантов пробоподготовки *ex vivo* образцов опухоли. Сравнение полученных данных производилось с результатами *in vivo* исследования тех же опухолей. При анализе времен жизни флуоресценции НАД(Ф)Н и процентных вкладов свободной и связанной форм кофактора выявлено, что наиболее близкие к *in vivo* данным были значения, полученные с образцов, находившихся в 10% растворе бычьего сывороточного альбумина на льду [A18]. Это позволяло сохранять параметры флуоресценции НАД(Ф)Н неизменными в течение минимум 3 ч после забора материала, что достаточно для транспортировки образцов из клиники и проведения исследования.

Послеоперационные образцы опухолей транспортировали в указанных условиях в максимально короткие сроки, свежий образец помещали в культуральную чашку для конфокальной микроскопии со стеклянным дном, находили область интереса в режиме быстрого сканирования по

интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н и получали FLIM-изображения НАД(Ф)Н (до 10 с каждого образца).

2.2.2 FLIM НАД(Ф)Н на макро-уровне

Ограничением FLIM-микроскопии для развития клинических приложений является небольшой размер изображений (обычно 256x256 мкм) и техническая сложность микроскопических систем. Альтернативой является флуоресцентный макроимиджинг с временным разрешением (макро-FLIM), позволяющий быстро исследовать большие площади тканей в операционном поле или крупные изолированные образцы тканей. Для получения макроскопических FLIM-изображений на сегодняшний день предложено несколько технических решений: широкопольный (wide-field) FLIM [66-68], конфокальный макро-FLIM [A15] и оптоволоконные системы на основе время-разрешенной спектроскопии [69, 70]. Среди них конфокальный макро-FLIM обеспечивает наиболее высокое пространственное и временное разрешение.

В нашей работе использован конфокальный FLIM/PLIM-макросканер (Becker & Hickl, Германия) на основе TCSPC, оснащенный пикосекундными диодными лазерами с длинами волн 375, 405, 488 и 594 нм. Макросканер обеспечивает пространственное разрешение до 15 мкм и сканирование поля зрения размером до 18x18 мм [A15]. Возбуждение НАД(Ф)Н производится на длине волны 375 нм, флуоресценция регистрируется в диапазоне 435-485 нм. Мощность излучения на образце 18 мВт. Время сбора фотонов 90-120 с.

Для получения изображений опухолей животных *in vivo*, необходимо открывание кожного лоскута над опухолью, т.к. кожа не проницаема для света с длиной волны 375 нм. Наркотизированная мышь с открытой опухолью на бедре размещается в положение на боку так, чтобы опухоль располагалась под сканирующей линзой.

Для получения изображений образцов тканей *ex vivo* используются свежие образцы сразу после извлечения. Если требуется транспортировка образца, используется протокол пробоподготовки, описанный выше.

При обработке FLIM-изображений анализируется сигнал, усредненный по образцу или в области интереса. Методика построения и анализа кривых затухания флуоресценции НАД(Ф)Н та же, что и при обработке микроскопических изображений.

2.3 Принципы мультипараметрического имиджинга с использованием FLIM НАД(Ф)Н

При изучении опухолевого метаболизма представляет интерес одновременное исследование нескольких комплементарных друг другу параметров. Применение флуоресцентных и фосфоресцентных сенсоров в комбинации с НАД(Ф)Н открывает возможность таких

мультипараметрических исследований энергетического метаболизма, т.е. оценки сразу нескольких показателей в одной и той же клетке или опухоли.

Ведется активная работа в химии и генной инженерии по созданию новых красителей и белков, обладающих сенсорными свойствами. Большое внимание уделяется разработке флуоресцентных сенсоров, работающих в области «оптического окна прозрачности» тканей (700-1000 нм). Особый интерес среди них представляют *генетически кодируемые флуоресцентные белки* – сенсоры физиологических показателей клетки [39, 71, 72]. Стабильная экспрессия белка в заданной локализации в клетке и низкая токсичность дают им преимущества перед химическими красителями.

Изначально, время-разрешенная регистрация флуоресценции рассматривалась как способ разделения флуорофоров со схожими спектральными характеристиками. Однако для этого необходимо, чтобы времена жизни флуоресценции детектируемых флуорофоров различались значительно (на сотни наносекунд). С учетом сложной, двух-экспоненциальной кинетики затухания НАД(Ф)Н, покрывающей диапазон времен жизни от ~0.3 до ~3.5 нс, одновременная регистрация его с другими флуорофорами сине-зеленой области с последующим разделением по временному принципу, используя стандартную конфигурацию FLIM-систем, представляется невозможной. Это может быть достигнуто только с помощью специальных узкополосных спектральных детекторов временного разрешения, как показано нами в работе [A57].

На практике может быть выполнена одновременная регистрация флуоресценции НАД(Ф)Н и красных флуорофоров. Нами разработаны методики одновременной визуализации НАД(Ф)Н и красных флуоресцентных белков: mKate2 (в составе сенсора каспазы-3 mKate-DEVD-iRFP и сенсора фаз клеточного цикла FUCCI-Red) [A7, A27], mCherry (в составе сенсора клеточного цикла FUCCI-Red) [A27] и SypHer-Red (сенсор внутриклеточного pH) [A38]. Заметим, что те же белки mKate2, mCherry и др. со схожими спектральными характеристиками, могут быть применены самостоятельно для мечения и идентификации опухолевых клеток или опухолей в задачах метаболического имиджинга [A15, A39].

Одновременная время-разрешенная регистрация флуоресценции НАД(Ф)Н и указанных красных флуоресцентных белков в опухолевых клетках и опухолях *in vivo* реализована нами на лазерном сканирующем микроскопе LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) и конфокальном FLIM/PLIM макросканере (Becker&Hickl, Германия). Спектральные настройки для их одновременного детектирования представлены в таблице 1.

Во избежание пертурбации относительно слабой флуоресценции НАД(Ф)Н флуоресценцией другого флуорофора, их спектры не должны перекрываться с НАД(Ф)Н. Оптимально, чтобы максимум поглощения второго флуорофора лежал на длине волны >570 нм. Имиджинг красного

флуоресцентного белка и НАД(Ф)Н в режиме FLIM производится последовательно с одного и того же поля зрения. Порядок съемки значения не имеет.

Таблица 1. Спектральные настройки для мультипараметрического имиджинга НАД(Ф)Н и красных флуоресцентных белков-сенсоров.

Флуорофор	НАД(Ф)Н	mKate2 (в составе сенсора mKate-DEVD-iRFP)	mCherry (в составе сенсора FUCCI-Red)	SypHer-Red
FLIM-микроскопия				
Возбуждение, нм	750	1000	1040	1040
Эмиссия, нм	450-500	595-670	600-660	570-640
Макро-FLIM				
Возбуждение, нм	375	594	594	594
Эмиссия, нм	435-485	608-682	608-682	608-682

В принципе, спектральные характеристики ФАД так же позволяют проводить регистрацию его флуоресценции одновременно с красными флуоресцентными белками, что было нами апробировано в случаях с FUCCI-Red [A27] и mKate-DEVD-iRFP [A36]. Так что наряду с параметрами затухания НАД(Ф)Н может быть оценено и редокс-отношение ФАД/НАД(Ф)Н.

При подобных мультипараметрических измерениях на лазерном сканирующем микроскопе нужно помнить, что многократное сканирование одних и тех же живых клеток чревато выгоранием флуорофоров и фотоповреждением клеток. Особенно важно это учитывать в задачах с наблюдением каких-либо процессов в динамике (time-lapse). Поэтому для каждого конкретного эксперимента приходится искать компромисс между временем сбора фотонов для построения FLIM-изображений, количеством последовательных съемок разных флуорофоров с одного поля зрения, их кратностью и временем между съемками.

С точки зрения одновременной визуализации с флуоресценцией НАД(Ф)Н, применение сенсоров, обладающих *фосфоресценцией*, имеет определенные преимущества по сравнению с флуоресцентными красителями. А именно, фосфоресценция, как разновидность эмиссии из низкоэнергетического триплетного возбужденного состояния молекулы, характеризуется значительно более длинными временами затухания - от мкс до мс, а значит, может быть легко отделена от флуоресценции, которая у большинства флуорофоров лежит в наносекундном диапазоне. В отличие от флуоресценции, фосфоресценция характеризуется большим Стоксовым сдвигом в длинноволновую область спектра (от 600 нм и дальше), что

снижает требования к ее спектральной фильтрации. В то же время, квантовый выход фосфоресцентной эмиссии гораздо ниже (0.01-0.15), чем у флуоресценции (0.1-0.95), что требует более длительного времени накопления сигнала для построения кривых затухания.

Большинство фосфоресцентных красителей проявляют чувствительность к содержанию кислорода в среде, поскольку молекулярный кислород является эффективным тушителем фосфоресценции. Методы на основе регистрации *фосфоресценции с временным разрешением PLIM* легли в основу нового подхода к минимально инвазивной количественной оценке кислородного статуса клеток и тканей [73]. Суть этих методов заключается в измерении времени затухания фосфоресценции кислород-чувствительных красителей, или фосфоров. Время жизни фосфоресценции обратно пропорционально концентрации молекулярного кислорода, что описывается уравнением Штерна-Фольмера - с увеличением концентрации кислорода время жизни фосфоресценции линейно снижается [74].

Благодаря тому, что системы детектирования люминесценции с временным разрешением на основе TCSPC сочетают в себе опции флуоресцентного и фосфоресцентного имиджинга, открывается возможность одновременного исследования метаболизма и оксигенации тканей. Принцип одновременной регистрации флуоресценции и фосфоресценции строится на модуляции лазерного излучения, при этом регистрация фотонов флуоресценции происходит во время работы импульсного лазера, а фотонов фосфоресценции – в периоды, когда лазер «выключен» [A21].

Нами разработаны методики *in vivo* оценки кислородного статуса опухолей животных на основе измерений времени жизни фосфоресценции кислородных сенсоров, а также методики комбинированных измерений фосфоресценции и флуоресценции НАД(Ф)Н для различных модальностей визуализации - оптоволоконной фосфоресцентной спектроскопии, фосфоресцентного макро-имиджинга и фосфоресцентной микроскопии (см. раздел 2.8.1).

К настоящему времени создан целый ряд фосфоресцентных сенсоров для оценки содержания кислорода во внутри- и внеклеточном пространстве, большинство из которых представляют собой органические комплексы с металлами переходной группы – Pt, Pd, Ru, Eu, Ir [40]. Однако лишь немногие из них пригодны для *in vivo* исследований в силу разных причин, например, высокой токсичности, низкой водорастворимости или слабого квантового выхода фосфоресценции. Проведенные нами исследования некоторых новых металлокомплексов с Ir(III) на предмет цитотоксичности, накопления в опухолевых клетках и тканях, чувствительности к кислороду в биологических средах подтвердили это [A25, A35, A51]. Для экспериментов *in vivo* нами были использованы кислород-чувствительные красители NanO2 (Luxcel Biosciences Ltd., Ирландия) [75], ВTPDM1 на основе бензотиенилпиридина с иридием (III) (Университет Гунма, Япония) [76] и

Pt3 на основе полинорборненовых мицелл с Ir(III) (ИМХ РАН) [A40]. Если длина волны возбуждения фосфоресцентного красителя лежит в диапазоне возбуждения НАД(Ф)Н, регистрация фосфоресценции и флуоресценции может быть выполнена при их одновременном возбуждении одним лазерным импульсом (как, например, в случае Pt3) [A40]. В противном случае, получение PLIM и FLIM изображений производится последовательно при возбуждении на длинах волн, близких к максимумам эмиссии НАД(Ф)Н и фосфоресцентного красителя.

Необходимо отметить, что калибровки кислородных сенсоров, выполненные на растворах, не подходят для определения абсолютных концентраций кислорода в клетках и тканях, поскольку внутриклеточное микроокружение может вносить «искажения» во времена жизни фосфоресценции сенсоров, в чем мы неоднократно убеждались в своих исследованиях. Калибровка сенсора на клетках требует установки специального мини-инкубатора с регулируемым содержанием кислорода на микроскоп, что не всегда возможно. Так что с помощью PLIM, как правило, оценивается относительное содержание кислорода в биологических объектах по времени жизни фосфоресценции без перевода значений в единицы концентрации.

2.4. Особенности энергетического метаболизма опухолей в условиях естественного роста по данным FLIM

2.4.1 FLIM-микроскопия опухолевых сфероидов, опухолей мышей *in vivo* и образцов опухолей пациентов

С помощью FLIM НАД(Ф)Н были исследованы особенности энергетического метаболизма опухолевых клеток в сложных моделях – опухолевых сфероидов и опухолях мышей, а также образцах опухолей пациентов.

Опухолевый сфероид представляет собой *in vitro* многоклеточную 3D модель опухоли до стадии формирования сосудов, которая лучше отражает ее структурные особенности по сравнению с монослойной культурой, но более проста и воспроизводима по сравнению с опухолями животных [77]. Исследование метаболического статуса опухолевых сфероидов HeLa проводили на 3, 5 и 7 день культивирования, чтобы проследить все стадии роста до разрушения. Показано, что время жизни флуоресценции НАД(Ф)Н в клетках сфероида принимает типичные значения: ~ 0.4 нс для свободной формы (τ_1) и ~ 2.6 нс для связанной формы (τ_2) и не отличается для разных зон и сфероидов разного размера. Ключевым результатом этой работы было обнаружение метаболической гетерогенности внутри сфероидов на всех сроках роста, которая однако была более выражена в зрелых сфероидов, имеющих морфологическую зональность (5-7 дни, размер 300-500 мкм) [A13]. Гетерогенность выражалась в более высоких значениях относительного вклада свободной формы НАД(Ф)Н a_1 в клетках

периферической зоны, что указывает на более высокую интенсивность гликолиза, по сравнению с клетками зоны покоя. Выявлено, что в процессе роста сфероидов метаболизм клеток центральной зоны меняется в сторону окисления (снижается a_1 НАД(Ф)Н), тогда как метаболизм периферических слоев остается стабильным. В отличие от сфероидов, монослойные культуры библиотечных линий метаболической гетерогенностью не обладают [A49]. Для подтверждения связи процессов клеточного дыхания и пролиферативной активности, нами были проведены эксперименты по наблюдению флуоресценции НАД(Ф)Н в клетках, экспрессирующих сенсор фаз клеточного цикла FUCCI-Red (рис. 3).

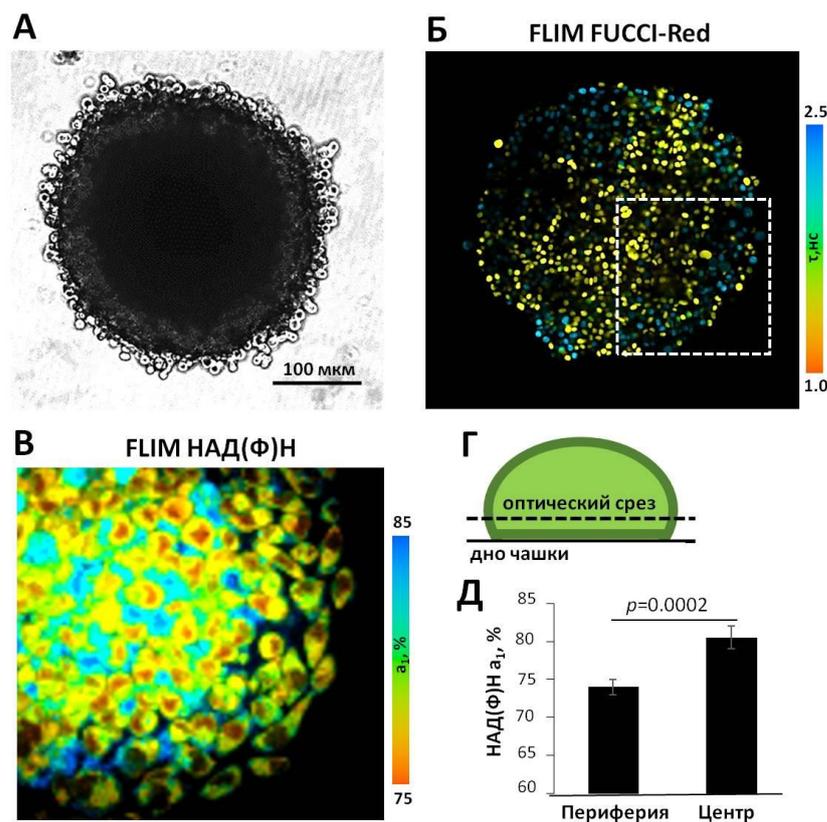


Рисунок 3. Одновременная визуализация флуоресцентного сигнала НАД(Ф)Н и сенсора фаз клеточного цикла FUCCI-Red в опухолевых сфероидах из клеток колоректального рака мыши СТ26 с помощью FLIM-микроскопии. А – Микроскопическое изображение сфероидов в проходящем свете на 7-й день роста. Б – FLIM-изображение в канале сенсора FUCCI-Red (возб. 1040 нм, рег. 598-660 нм). В - FLIM-изображение в канале НАД(Ф)Н (возб. 750 нм, рег. 450-500 нм). Показана часть сфероидов, выделенная пунктирным квадратом на Б. Г - Схематичное изображение сфероидов на дне культуральной чашки для конфокальной микроскопии. Д – Относительный вклад свободной формы НАД(Ф)Н a_1 в клетках периферической и центральной зон сфероидов.

Результаты показали, что наружные слои клеток сфероидов с повышенными значениями a_1 НАД(Ф)Н находятся в фазе деления S/G2/M, а клетки центральной части - в фазе роста или покоя G1/G0 [A27].

Логично было бы предположить, что клетки внутреннего слоя должны использовать гликолиз в большей степени, чем клетки наружного слоя, в связи с меньшим содержанием кислорода. Однако полученные результаты свидетельствуют об обратном. Клетки наружных слоев активно пролиферируют и имеют в свободном доступе питательные вещества и кислород, поэтому источником энергии в них является преимущественно аэробный гликолиз («эффект Варбурга»). Тогда как клетки зоны покоя находятся в менее благоприятных условиях, имеют сниженную пролиферацию, но при достаточном количестве кислорода демонстрируют окислительный метаболизм.

Аналогичные эксперименты были проведены на сфероидах из клеток библиотечной линии глиобластомы U373 MG и клеток глиобластом пациентов. Было установлено, что сфероиды глиобластом имеют меньшие размеры – максимум до 130 мкм на 7-й день роста и не демонстрируют морфологической и метаболической зональности, что вероятно обусловлено иными закономерностями их роста (например, умеренной скоростью роста или диффузным распределением пролиферирующих клеток). Однако межклеточная гетерогенность метаболизма в индивидуальных сфероидах из первичных культур была выше, чем в сфероидах из библиотечной линии, что выражалось в большом разбросе значений a_1/a_2 НАД(Ф)Н [A47]. Этот результат можно объяснить тем, что клетки, выделенные из опухолей пациентов, при краткосрочном культивировании, вероятно, сохранили фенотипическую гетерогенность, присущую исходной опухоли. При росте в условиях гипоксии (3.5% O_2) клетки сфероидов показывали ожидаемый переход на анаэробный гликолиз – снижение τ_m , увеличение a_1/a_2 НАД(Ф)Н, при этом различия становились более выраженными при длительном (7 дней) влиянии гипоксии [A47, A55].

Метаболическая гетерогенность в модели опухолевого сфероида на клеточном уровне была нами продемонстрирована впервые.

В *опухолях животных* на биоэнергетику клеток влияют не только гистогенетические и пролиферативные особенности, но и факторы опухолевого микроокружения. В *in vivo* исследованиях методом FLIM-микроскопии нами показано, что опухоли у мышей, включая ксенографты опухолей человека, метаболически гетерогенны [A17, A40, A49, 78]. В большинстве случаев, они демонстрируют более высокий разброс значений вкладов свободной и связанной форм НАД(Ф)Н по сравнению с клеточными линиями, из которых они получены. Также на ксенографтах рака шейки матки человека HeLa *in vivo* нами было замечено, что в пределах одной опухоли клетки, находящиеся в окружении плотной коллагеновой стромы, более гликолитичны по сравнению с клетками из зон с низкой представленностью стромального компонента – вклад свободной формы a_1 НАД(Ф)Н в них составлял 75.5 ± 2.4 % vs. 80.8 ± 2.7 % ($p = 0.00001$), среднее время жизни τ_m – 1.05 ± 0.11 % vs. 1.8 ± 0.25 % ($p = 0.00001$) (рис. 4).

Характерно, что в клеточной культуре HeLa значения вклада a_1 НАД(Ф)Н были близки к значениям, полученным в «клеточной» зоне опухоли, $76.01 \pm 1.14 \%$.

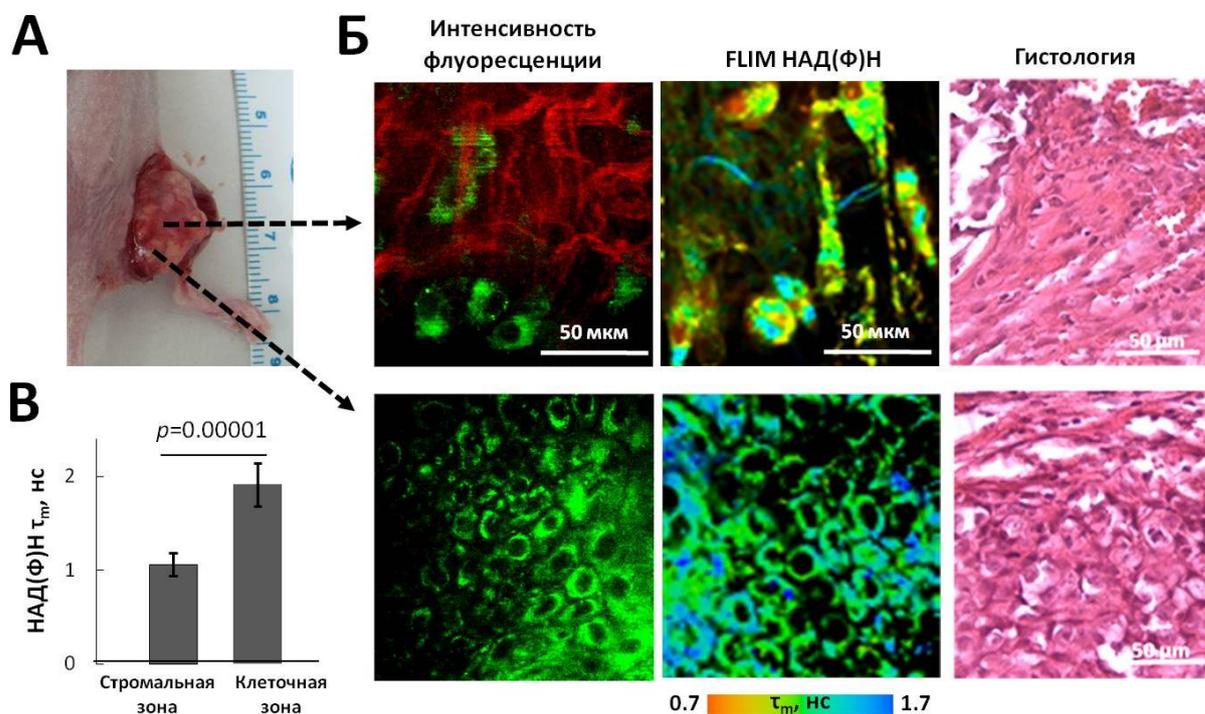


Рисунок 4. In vivo FLIM-микроскопия кофактора НАД(Ф)Н в опухоли HeLa, демонстрирующая отличия метаболизма в клеточной и стромальной зонах. А – Фотография мыши nude с опухолью HeLa на бедре на 17 день роста. Стрелками показаны области исследования. Б – Двухфотонная флуоресцентная микроскопия на многофотонном томографе MPTflex. Репрезентативные изображения интенсивности автофлуоресценции НАД(Ф)Н (зеленый цвет) с наложением сигнала генерации второй гармоники от коллагена (красный цвет) из клеточной и стромальной зон опухоли. FLIM-микроскопия НАД(Ф)Н с тех же полей зрения. Гистологические изображения клеточной и стромальной зон опухоли. Окраска гематоксилином и эозином. В – Оценка среднего время жизни τ_m НАД(Ф)Н в клеточной и стромальной зонах опухоли. Среднее \pm SD (n=3 опухоли по 30-40 клеток в каждой).

Подтверждением влияния опухолевой стромы, включая коллаген и опухоль-ассоциированные фибробласты, на энергетический метаболизм опухолевых клеток являются результаты наших in vitro экспериментов, в которых опухолевые клетки культивировались совместно с фибробластами и/или в присутствии коллагенового матрикса [A22]. Было установлено, что при кокультивировании опухолевых клеток HeLa с нормальными фибробластами наблюдается увеличение вкладов a_1 НАД(Ф)Н и a_1 ФАД и снижения редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н, что говорит о переключении опухолевых клеток на гликолиз [A6]. Активация гликолиза по данным FLIM-микроскопии НАД(Ф)Н зарегистрирована и в клетках колоректального рака человека HCT116 и HT29 в присутствии нормальных фибробластов, что позволяет сделать вывод об универсальном влиянии фибробластов на

биоэнергетику опухолевых клеток (рис. 5). В самих фибробластах при этом энергетический метаболизм мог оставаться неизменным (в случае HT29), либо меняться в сторону окислительного фосфорилирования (в случае HeLa) или гликолиза (в случае HCT116) [A19]. В любом случае, изменения в опухолевых клетках были более выражены, что говорит об их большей метаболической пластичности. В опухолевых клетках T24, растущих в коллагене без фибробластов, также отмечен сдвиг в сторону гликолиза [A42].

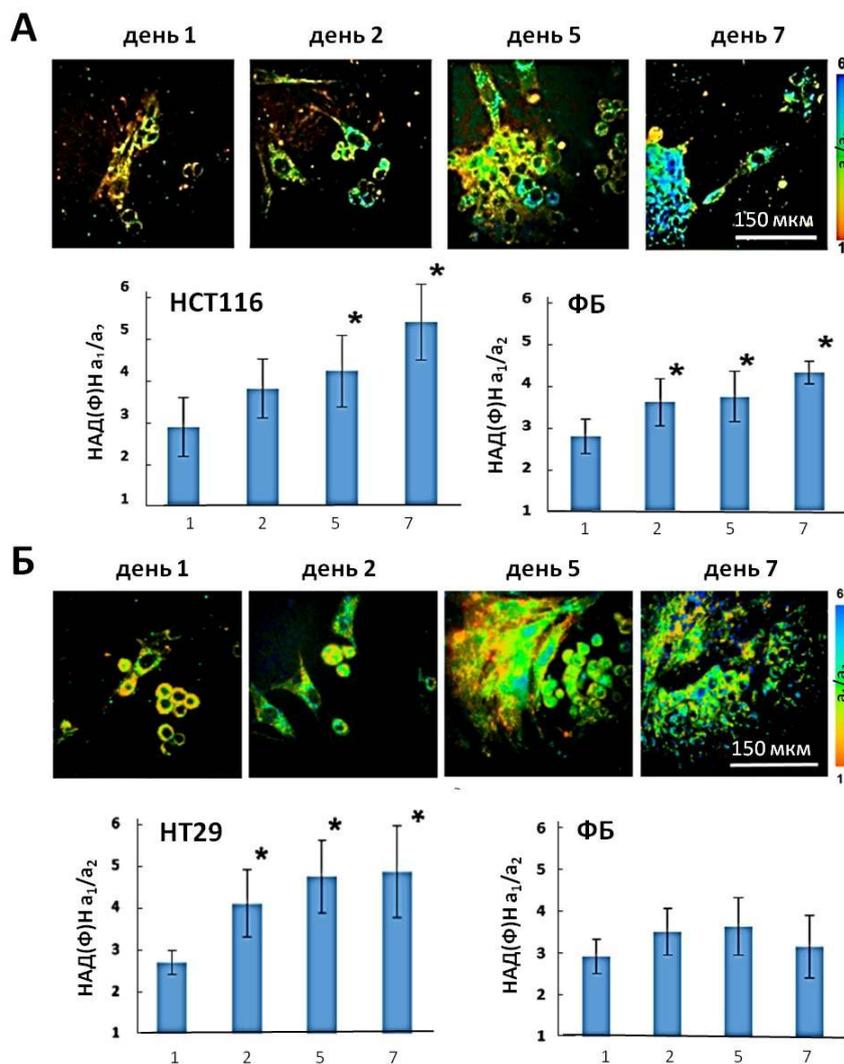


Рисунок 5. Изменения в энергетическом метаболизме клеток колоректального рака человека HT29 и HCT116 и нормальных фибробластов (ФБ) в процессе кокультивирования. А – FLIM-изображения НАД(Ф)Н в кокультуре HCT116 и фибробластов; гистограммы отношения свободного/связанного a_1/a_2 НАД(Ф)Н. Б – FLIM-изображения НАД(Ф)Н в кокультуре HT29 и фибробластов; гистограммы отношения свободного/связанного a_1/a_2 НАД(Ф)Н. Среднее \pm SD. *- $p < 0.05$ в сравнении с 1-м днем.

При оценке вкладов свободной и связанной форм НАД(Ф)Н в опухолях мышей *in vivo* в процессе роста было обнаружено, что энергетический метаболизм опухоли не остается постоянным. Повышение уровня гликолиза (большой вклад a_1 НАД(Ф)Н) отмечалось в крупных опухолях на поздних

стадиях роста по сравнению с опухолями более ранних сроков [A17], что вероятно обусловлено развитием в них гипоксии. При этом согласно данным FLIM с FUCCI-Red, доля клеток в S/G2/M фазе в них снижалась [A27]. Что характерно, межопухолевые отличия в кинетике флуоресценции НАД(Ф)Н по данным FLIM были слабо выражены для опухолей одного срока роста (размера), полученных из библиотечных линий. Однако в ксенографтах, полученных из опухолевого материала пациентов, параметры затухания флуоресценции отличались существенно, что было показано нами на ортотопической модели глиобластомы [A39].

Эти исследования на модельных опухолях *in vivo* продемонстрировали возможности метода FLIM для визуализации внутри- и межопухолевой гетерогенности энергетического метаболизма и подтвердили имеющиеся представления о его пластичности.

Для понимания особенностей энергетического метаболизма опухолей важным этапом была работа на операционных *образцах опухолей пациентов*. С помощью FLIM-микроскопии было охарактеризовано метаболическое состояние клеток колоректального рака *ex vivo* (рис. 6). Сравнение метаболизма опухолевых клеток с нормальной тканью кишечника, взятого на удалении от опухоли, показало, что клетки эпителия кишечника более гликолитичны (имеют более высокий a_1 НАД(Ф)Н), чем первичные умеренно-дифференцированные опухоли T3 стадии ($p=0.0034$). Статистически значимых отличий между опухолями T3 и T4 стадий не выявлено ввиду высокой межопухолевой гетерогенности и малого размера выборки. Существенные отличия опухолей от нормы были отмечены в их межклеточной метаболической гетерогенности – разброс значений вкладов свободного и связанного НАД(Ф)Н в опухоли был как минимум в 2 раза выше, чем в образцах нормальной ткани [A18].

В недавнем исследовании мы впервые количественно охарактеризовали степень внутриопухолевой метаболической гетерогенности на клеточном уровне, используя индекс бимодальности (Bimodality Index, BI) и дисперсию параметра a_1 НАД(Ф)Н. Индекс бимодальности описывает соответствие распределения параметра двум Гауссовым кривым (т.е. двум модам). В случае данных FLIM НАД(Ф)Н $BI \geq 1.1$ означает, что в клеточной популяции присутствуют два кластера клеток с различной интенсивностью гликолиза и митохондриального дыхания. Дисперсия характеризует разброс значений параметра относительно его математического ожидания.

Установлено, что рак толстой кишки пациентов обладает высокой межклеточной гетерогенностью энергетического метаболизма (рис. 6). Это существенно отличало опухоли пациентов от клеточных линий и опухолевых ксенографтов у мышей, которые считаются генетически однородными и стабильными. Все опухолевые образцы демонстрировали высокий разброс значений a_1 НАД(Ф)Н, а половина исследованных образцов (10 из 21) - высокий коэффициент бимодальности (>1.1), указывающий на присутствие в

опухоли двух субпопуляций клеток с различным метаболическим профилем. Оценена корреляция индекса бимодальности и дисперсии a_1 НАД(Ф)Н и клинично-патологических характеристик опухолей (TNM стадия, грейд). Дисперсия a_1 статистически значимо ($p=0.01$) была выше в опухолях высокой степени злокачественности G3.

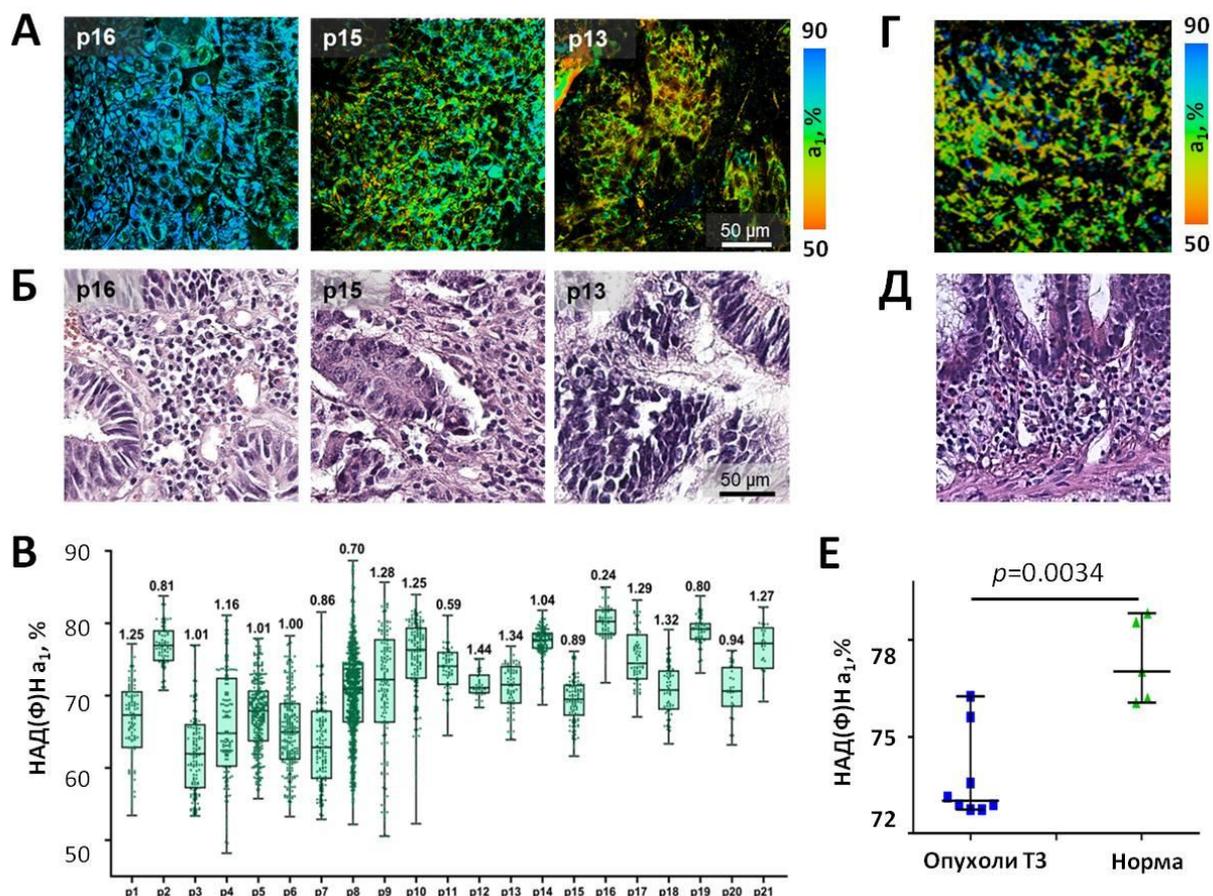


Рисунок 6. Гетерогенность энергетического метаболизма клеток колоректального рака пациентов по данным FLIM-микроскопии НАД(Ф)Н. А – Репрезентативные FLIM-изображения трех послеоперационных образцов опухолей. P16 - аденокарцинома прямой кишки умеренно-дифференцированная T3N1M0 (стадия IIIb), P15 - аденокарцинома слепой кишки низкодифференцированная T3N1M0 (стадия IIIb), P13 - аденокарцинома слепой кишки умеренно-дифференцированная T3N1M0 (стадия IIIb). Б – Гистологические изображения опухолей. Окраска гематоксилином и эозином. В – Значения относительного вклада свободной формы a_1 НАД(Ф)Н в индивидуальных опухолях. Точки – измерения в отдельных клетках. Показаны медианы, 25-й и 75-й процентиля, минимумы и максимумы. Над диаграммами приведены значения индекса бимодальности BI- a_1 . Г - Репрезентативное FLIM-изображение нормального эпителия кишечника на отдалении от опухоли. Д - Гистологическое изображение нормальной ткани кишечника. Е – Сравнение параметра a_1 НАД(Ф)Н в колоректальном раке T3 стадии и нормальном эпителии кишечника. Точки – измерения в отдельных образцах тканей.

Таким образом, данные FLIM-микроскопии подтвердили существующие представления о вариабельности процессов клеточного

дыхания в опухолях [A49]. Продемонстрировано влияние на энергетический метаболизм опухолевых клеток различных факторов – пролиферативной активности, стромального компонента, гипоксии, генетической разнородности, степени злокачественности новообразований. Несмотря на очевидность нашего наблюдения высокой межклеточной метаболической гетерогенности опухолей пациентов, ранее она не была визуализирована и количественно оценена в опухолевой ткани.

2.4.2 Возможности макро-FLIM для дифференцирования опухоли от нормальной ткани

В своих исследованиях мы впервые показали, что конфокальный макро-FLIM обладает достаточной чувствительностью для регистрации автофлуоресценции НАД(Ф)Н в тканях животных. На подкожных опухолях мышей СТ26 было показано, что регистрируемые времена жизни НАД(Ф)Н соответствуют типичным значениям и составляют $\tau_1 \sim 0.5$ нс и $\tau_2 \sim 2.9$ нс. Относительный вклад свободной (a_1) формы составлял $85 \pm 5\%$. Для сравнения, в окружающей опухоль мышечной ткани этот вклад составлял $77 \pm 4\%$ [A15]. Полученные результаты указывали на более высокую интенсивность гликолиза в опухоли по сравнению с мышцей. В том же исследовании мы показали, что НАД(Ф)Н может регистрироваться в опухоли одновременно с эмиссией красного флуоресцентного белка mKate2. Экспрессия флуоресцентного белка опухолью помогает точно идентифицировать ее на FLIM-изображениях (рис. 7).

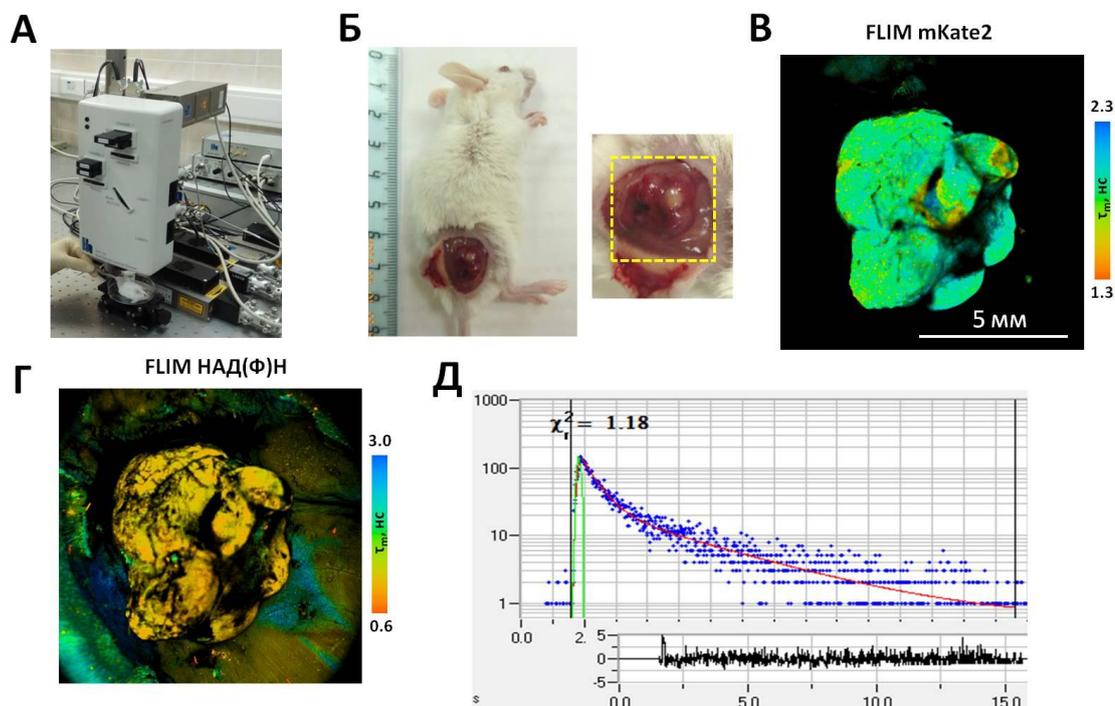


Рисунок 7. Макро-FLIM опухоли мыши СТ26 *in vivo* с одновременной визуализацией НАД(Ф)Н и красного флуоресцентного белка mKate2. А – Фотография конфокального FLIM/PLIM-макросканера во время эксперимента. Б – Фотография мыши с подкожной опухолью СТ26 с открытым кожным лоскутом;

увеличенная фотография опухоли (область сканирования показана пунктиром). В – FLIM-изображение опухоли в канале НАД(Ф)Н (возб. 375 нм, рег. 435-485 нм). Г – FLIM-изображение опухоли в канале mKate2 (возб. 375 нм, рег. 608-682 нм). Д – Кривая затухания НАД(Ф)Н в опухоли. Синие точки – экспериментальные данные, красная кривая – аппроксимация, зеленая кривая – аппаратная функция.

В дальнейшем макро-FLIM был апробирован для дифференцирования глиом от нормальных тканей мозга. Эксперименты проводились на интракраниальных опухолевых моделях крыс и мышей. Изображения получали со свежееизвлеченных образцов мозга *ex vivo*. На глиобластоме крыс 101.8 было выявлено, что среднее время жизни флуоресценции τ_m НАД(Ф)Н более длинное по сравнению с корой интактного мозга и более короткое по сравнению с белым веществом. В случае глиомы C6 и астроцитомы 101.8 у крыс время жизни флуоресценции τ_m в опухоли было более коротким по сравнению с белым веществом и не отличалось от коры [A28]. В ксенографтах глиобластомы человека U87 у мышей *nude* так же τ_m НАД(Ф)Н имело более короткие значения (1.24 ± 0.01 нс) по сравнению с белым веществом у тех же животных (1.449 ± 0.009 нс, $p=0.01$) и животных без опухоли (1.54 ± 0.03 нс, $p=0.002$) (рис. 8) [A39].

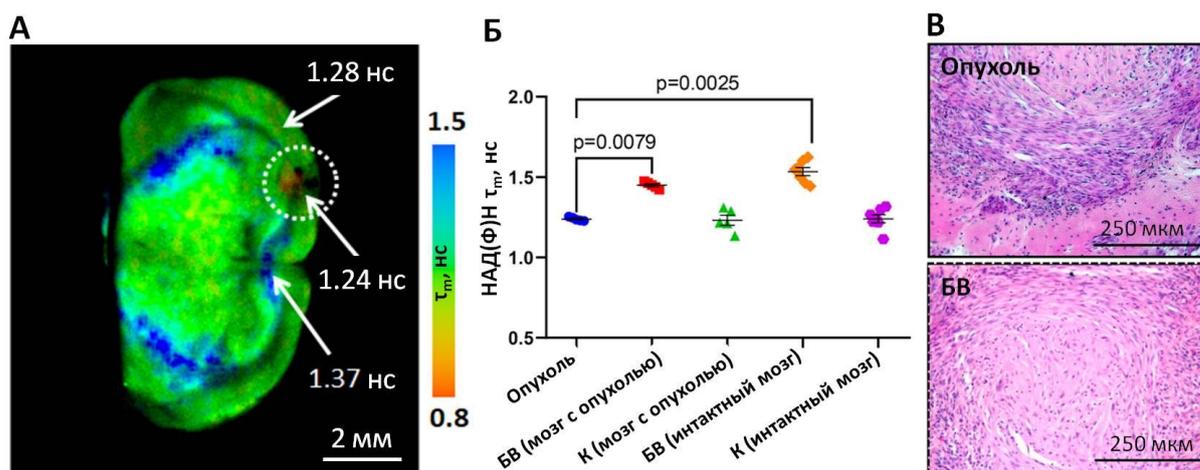


Рисунок 8. Макроскопический FLIM мозга мыши *nude* с глиомой человека U87 в спектральном канале НАД(Ф)Н. А – Репрезентативное FLIM-изображение свежего среза мозга. Область опухоли показана пунктиром. Б – Значения среднего времени жизни τ_m НАД(Ф)Н в опухоли и нормальных тканях мозга (БВ – белое вещество, К – кора). Точки – значения τ_m у индивидуальных животных. В – Гистологические изображения границы опухоли и белого вещества мозга мышей. Окраска гематоксилином и эозином.

Поскольку опухолевые модели из библиотечных линий не отражают в полной мере свойств опухолей человека, а именно, имеют ограниченную инвазию, морфологически и генетически однородны, большой интерес вызывают модели PDX (пациент-специфичные ксенографты). На оригинальной интракраниальной PDX модели, полученной из глиобластомы пациента и меченой флуоресцентным белком mKate2, было обнаружено, что все опухоли в группе ($n=10$) отличались более короткими значениями τ_m

НАД(Ф)Н от белого вещества ($p < 0.0001$), а часть из них (4 из 10) отличались более длинным временем жизни τ_m НАД(Ф)Н от коры мозга [A39]. Было замечено, что опухоли PDX, полученные из материала одной и той же опухоли пациента, были метаболически гетерогенны между собой в отличие от опухолей из библиотечных клеточных линий, что предполагает сохранение в них клонального разнообразия клеток.

Предварительные данные, полученные нами на операционных образцах глиобластом пациентов, показали возможность дифференцирования опухолей от белого вещества, не инфильтрированного опухолевыми клетками, с помощью макро-FLIM, измеряя соотношение короткой и длинной компонент затухания эмиссии НАД(Ф)Н a_1/a_2 [A28, A43]. Данное соотношение в опухолевых образцах было статистически выше - 2.02 vs 1.34, $p = 0.0413$.

Необходимо отметить, что зарегистрированные времена жизни НАД(Ф)Н τ_m и τ_2 в глиомах и белом веществе принимают более длинные значения, чем те, что детектируются в опухолевых клетках в культуре и опухолях *in vivo* другого происхождения. Это может быть обусловлено особенностями состава НАД(Ф)Н-связывающих белков в тканях мозга или вкладом иных флуорофоров (липофусцин, продукты окисления липидов) в регистрируемый сигнал, в чем еще предстоит разобраться.

Таким образом, макро-FLIM НАД(Ф)Н представляет собой перспективный инструмент для клинической интраоперационной диагностики опухолей, например, глиом, поскольку позволяет в реальном времени получать изображения достаточно крупных образцов тканей в макро-масштабе и обладает высокой чувствительностью в регистрации метаболических отличий опухоли от нормальной ткани.

2.5 Исследование метаболических изменений при апоптозе опухолевых клеток с использованием FLIM НАД(Ф)Н и генетически кодируемого сенсора активности каспазы-3

Апоптоз – сложный, эволюционно консервативный процесс программированной клеточной гибели – имеет существенное значение для опухолевой прогрессии, которая отчасти обусловлена его ингибированием, и для ответа опухолей на терапию. Важная роль в регуляции апоптоза отводится митохондриям, редокс-статусу клетки и АФК [79, 80]. Однако до сих пор не установлены взаимосвязи между различными метаболическими путями, рН и активацией каспаз. Спорным вопросом остается источник АФК при апоптозе – митохондриальная дыхательная цепь или НАДФН-оксидазы.

Многофотонная флуоресцентная микроскопия, в том числе с временным разрешением FLIM, в комбинации с генетически кодируемыми сенсорами позволяет проводить динамические, мультипараметрические исследования апоптоза как на клеточных культурах, так и моделях опухолей *in vivo* [A4]. Большинство генетически кодируемых сенсоров для анализа

апоптоза нацелены на регистрацию активности каспазы-3 – ключевой эффекторной каспазы апоптотического каскада реакций [A16].

С использованием нового генетически кодируемого FRET сенсора каспазы-3 mKate2-DEVD-iRFP нами был проведен мониторинг апоптотического процесса с одновременной регистрацией редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н и времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н в одних и тех же клетках в динамике [A9]. Сенсор mKate2-DEVD-iRFP сконструирован на основе двух флуоресцентных белков mKate2 и iRFP, соединенных узнаваемым каспазой-3 линкером [A7]. В соединенном состоянии, т.е. в отсутствие активной каспазы-3, между этими белками происходит Ферстеровская резонансная передача энергии (FRET), в результате чего белок-донор mKate2 имеет сниженные значения времени жизни флуоресценции по сравнению с нативной формой (1.4 vs 2.05 нс). При индукции апоптоза стауроспорином (5 мкМ) активация каспазы-3 в опухолевых клетках СТ26 наблюдалась, начиная с 2 ч инкубации, что было зарегистрировано по увеличению времени жизни флуоресценции донора с 1.58 ± 0.11 нс до 2.32 ± 0.25 нс. В тех же клетках редокс-отношение ФАД/НАД(Ф)Н начинало значимо расти, а вклад свободной формы НАД(Ф)Н a_1 начинал снижаться гораздо раньше – с 15 мин инкубации, указывая на активацию митохондриального дыхания.

Параллельно был выполнен эксперимент на клетках СТ26, экспрессирующих два сенсора – сенсор каспазы-3 mKate2-DEVD-iRFP и рН-сенсор SypHer1 [A9]. Было зарегистрировано снижение рН цитозоля с 7.19 ± 0.14 до 6.97 ± 0.13 ($p < 0.05$) на фоне воздействия стауроспорином через 15 мин у ~60% клеток и через 1 ч во всей популяции; сниженный рН сохранялся до 24 ч. Известно, что энергетический метаболизм клетки зависит от рН цитозоля, а его закисление способствует активации митохондриального дыхания [81]. Так что на основе этих данных можно утверждать, что активации каспазы-3 при апоптозе предшествуют скоординированные изменения метаболизма и рН.

В этом же исследовании было замечено, что при добавлении стауроспорина к клеткам наблюдается увеличение времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н τ_2 вплоть до 4 нс при типичных значениях 1.8-2.4 нс. Этот параметр определяется составом и пропорцией НАД(Ф)Н-связывающих ферментов. Согласно Blacker et al., выраженное увеличение τ_2 ассоциируется с увеличением вклада связанной с белками фосфорилированной формы НАДФН (τ 4.4 нс) в общий пул кофактора [56]. Этот вклад может быть определен путем 3-экспоненциальной аппроксимации кривых затухания НАД(Ф)Н, где вторая компонента (τ_2 , a_2) соответствует связанному НАДН, а третья (τ_3 , a_3) - связанному НАДФН [82].

В дальнейшей работе мы с помощью FLIM более детально изучили образование НАДФН в процессе апоптоза и оценили взаимосвязь между метаболическими перестройками и генерацией АФК в опухолевых клетках

[A36]. Была поставлена серия экспериментов по индукции апоптоза тремя агентами – стауроспорином, цисплатином и пероксидом водорода – в опухолевых клетках СТ26, экспрессирующих сенсор каспазы-3 mKate2-DEVD-iRFP. В тех же клетках проводился анализ кинетики флуоресценции НАД(Ф)Н с последующей окраской на внутриклеточные АФК стандартным красителем H₂DCFDA. В случае повышения τ_2 НАД(Ф)Н при классической би-экспоненциальной аппроксимации, кривые затухания аппроксимировались 3-экспоненциальной моделью. Было обнаружено, что третья компонента, соответствующая НАДФН, возникает только в случае стауроспорин-индуцированного апоптоза, при этом ее относительный вклад увеличивается с увеличением дозы препарата. Динамическое наблюдение показало раннее (через 30 мин инкубации) увеличение редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н и увеличение фракции связанного НАДН a_2 при воздействии любым из агентов, предполагая сдвиг баланса в сторону окислительного фосфорилирования. Эти изменения предшествовали или наблюдались одновременно с активацией каспазы-3 и хорошо коррелировали с продукцией АФК ($r=0.55-0.69$) (рис. 9). Стоит отметить, что при воздействии цисплатином, в отличие от других агентов, увеличение вклада a_2 НАДН наблюдалось в одинаковой степени в апоптотических и неапоптотических клетках, а значит, было неспецифическим ответом, не связанным с запуском апоптоза. В случае стауроспорина появление фракции НАДФН следовало за продукцией АФК, что позволяет предположить участие НАДФН в процессах детоксикации АФК скорее, чем в их продукции.

Нами была предпринята попытка оценить, индуцируются ли подобные метаболические изменения при апоптозе в условиях опухоли *in vivo*. После локальной инъекции стауроспорина были обнаружены обширные поля апоптотических клеток в опухоли по данным FLIM/FRET микроскопии с сенсором mKate2-DEVD-iRFP, что подтверждалось последующим гистологическим исследованием. Мы наблюдали статистически значимое увеличение τ_2 НАД(Ф)Н с ~ 2.47 нс до ~ 2.74 нс как в апоптотических, так и в неапоптотических клетках, без каких либо изменений в соотношении свободной и связанной фракций [A36]. Таким образом, *in vivo* исследование выявило схожую тенденцию с результатами *in vitro*, однако метаболические изменения в опухолях были менее выраженными, что вероятно связано с более сильными компенсаторными механизмами, направленными на поддержание редокс-баланса клеток.

Итак, нам впервые с помощью мультипараметрического имиджинга удалось установить последовательность метаболических событий при индукции апоптоза в опухолевых клетках и показать их взаимосвязи с рН и образованием АФК.

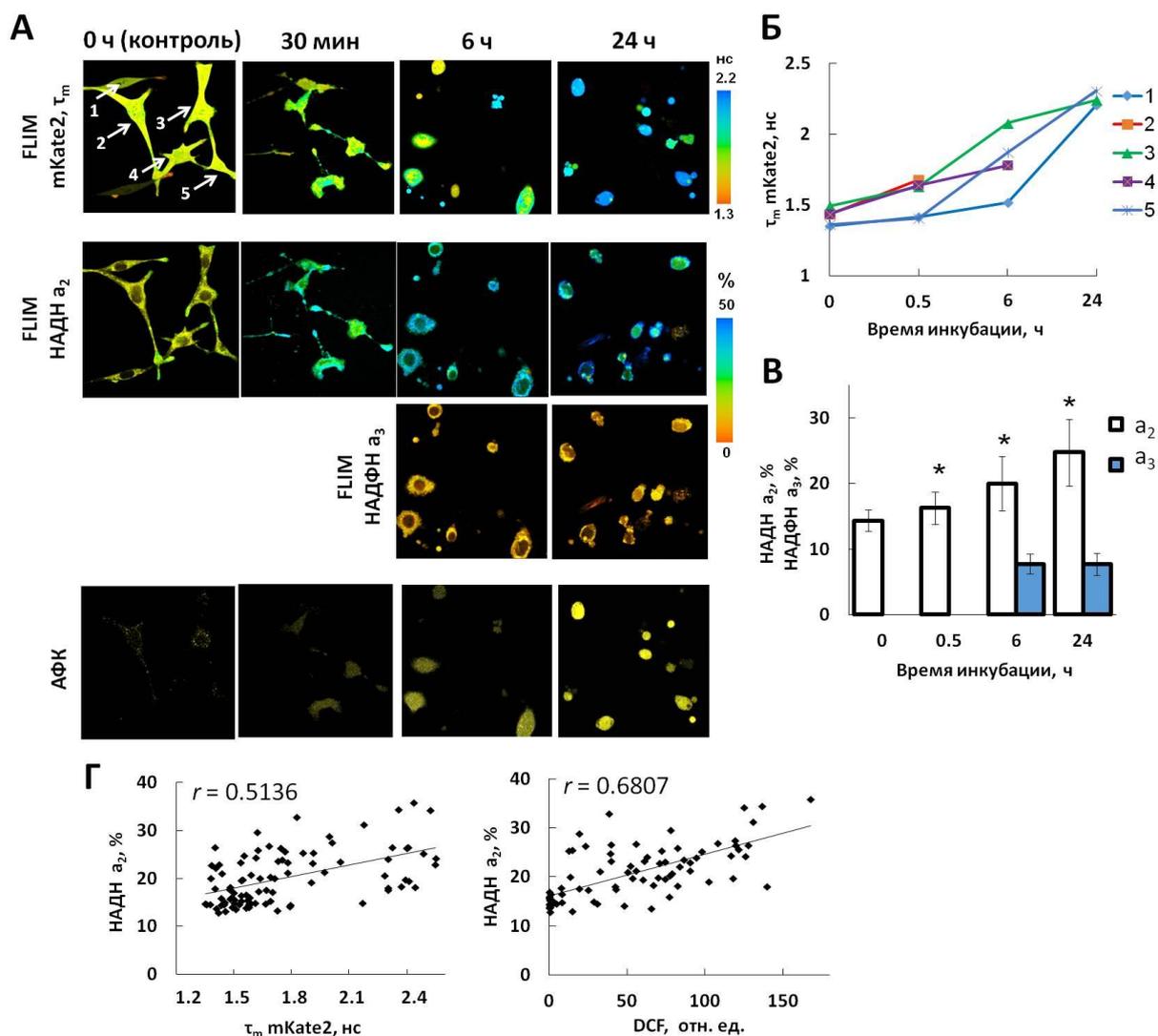


Рисунок 9. Мультипараметрический имиджинг апоптоза клеток колоректального рака мыши CT26 с помощью FLIM-микроскопии. А – Мониторинг активации каспазы-3 с применением генетически кодируемого сенсора mKate2-DEVD-iRFP: FLIM изображения флуоресценции белка-донора mKate2 с одного и того же поля зрения. FLIM изображения НАДН и НАДФН в динамике. Оценка внутриклеточного уровня АФК. Б – Изменение времени жизни флуоресценции mKate2 в индивидуальных клетках (1-5), обозначенных на контрольном FLIM-изображении. В - Относительные вклады связанной с белком формы НАДН a_2 и связанной с белком формы НАДФН a_3 . Среднее \pm SD. *- $p < 0.05$ в сравнении с контролем (0 ч). Г – Корреляции НАДН a_2 с активацией каспазы-3 и уровнем АФК. Точки – измерения в индивидуальных клетках.

2.6 Оценка ответа опухолей на химиотерапию с помощью оптического метаболического имиджинга

Химиотерапия остается стандартом в лечении онкологических заболеваний и назначается почти 80% пациентов с диагностированным онкозаболеванием. Между тем, в среднем 40% из них не отвечают на лечение. При этом частота ответа сильно варьирует для разных типов опухолей и составляет, например, в случае колоректального рака около 46%,

а в случае опухолей центральной нервной системы лишь около 9% [83]. На сегодняшний день при назначении химиотерапии не учитываются индивидуальные биологические особенности опухоли пациента, а выбор схемы лечения определяется гистологическим диагнозом и в некоторых случаях – молекулярно-генетическими маркерами. При этом используемые химиопрепараты высокотоксичны и вызывают массу побочных эффектов, которые снижают качество жизни пациентов. Поэтому разработка подходов к персонализации химиотерапии и мониторингу раннего ответа на химиотерапию является актуальной.

2.6.1 Изменение энергетического метаболизма опухолевых клеток при химиотерапии в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

Чтобы оценить возможности FLIM-микроскопии кофакторов для наблюдения ответа опухолевых клеток на химиотерапию, нами проведены исследования на клеточных культурах, опухолевых сфероидах и модельных опухолях мышей с применением химиопрепаратов различных классов.

При воздействии цисплатином (IC50 2.6 мкМ) – препаратом алкилирующего действия - на опухолевые клетки HeLa наблюдалось увеличение редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н с 0.52 ± 0.14 до 0.86 ± 0.16 ($p < 0.0001$), начиная с 6 ч инкубации с препаратом, за счет снижения интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н и увеличения интенсивности флуоресценции ФАД в клетках [A12]. Наиболее выраженный рост этого показателя (до 1.8 и выше) зарегистрирован через 24 ч и 48 ч. Анализ затухания флуоресценции НАД(Ф)Н в динамике после воздействия показал, что времена жизни короткой и длинной компонент принимают типичные значения – τ_1 0.44 нс и τ_2 2.58 нс, соответственно. Относительный вклад свободной формы НАД(Ф)Н a_1 снижался с $80.02 \pm 2.04\%$ до $77.82 \pm 1.69\%$ ($p = 0.00017$) через 6 ч и далее до $66.34 \pm 1.71\%$ ($p < 0.0001$) через 24 ч, сохраняясь на сниженном уровне через 48 ч. Оба показателя – увеличение редокс-отношения и снижение вклада свободной формы указывают на ингибирование гликолиза и переход на аэробное окисление для получения энергии. Обнаружена высокая корреляция редокс-отношения и вклада a_1 со снижением клеточной пролиферации ($r = -0.986$ и $r = 0.924$, соответственно).

В экспериментах *in vivo* на мышях с опухолями HeLa и СТ26 (колоректальный рак мыши) лечение цисплатином приводило к снижению вклада свободной формы НАД(Ф)Н a_1 относительно контрольных нелеченых опухолей, что согласуется с данными *in vitro*. В случае опухолевых ксенографтов HeLa FLIM микроскопия была проведена однократно на конечной точке эксперимента – 35-й день роста опухолей, 3 дня после последней инъекции цисплатина, когда опухоли имели признаки терапевтического ответа в виде торможения роста и патоморфологических изменений [A12]. Значения a_1 составляли $71.22 \pm 3.86\%$ в контроле и $79.48 \pm 2.87\%$ в леченых опухолях, $p < 0.0001$ (рис. 10). Для установления возможности оценки раннего ответа на терапию по данным FLIM в случае

опухолей СТ26 был проведен мониторинг флуоресценции НАД(Ф)Н в динамике на 7, 14 и 21-й дни роста. Показано, что соотношение вкладов свободной и связанной форм меняется на ранних сроках лечения (на 7-й день), до появления морфологических нарушений в опухолевой ткани и уменьшения объема новообразований [A17].

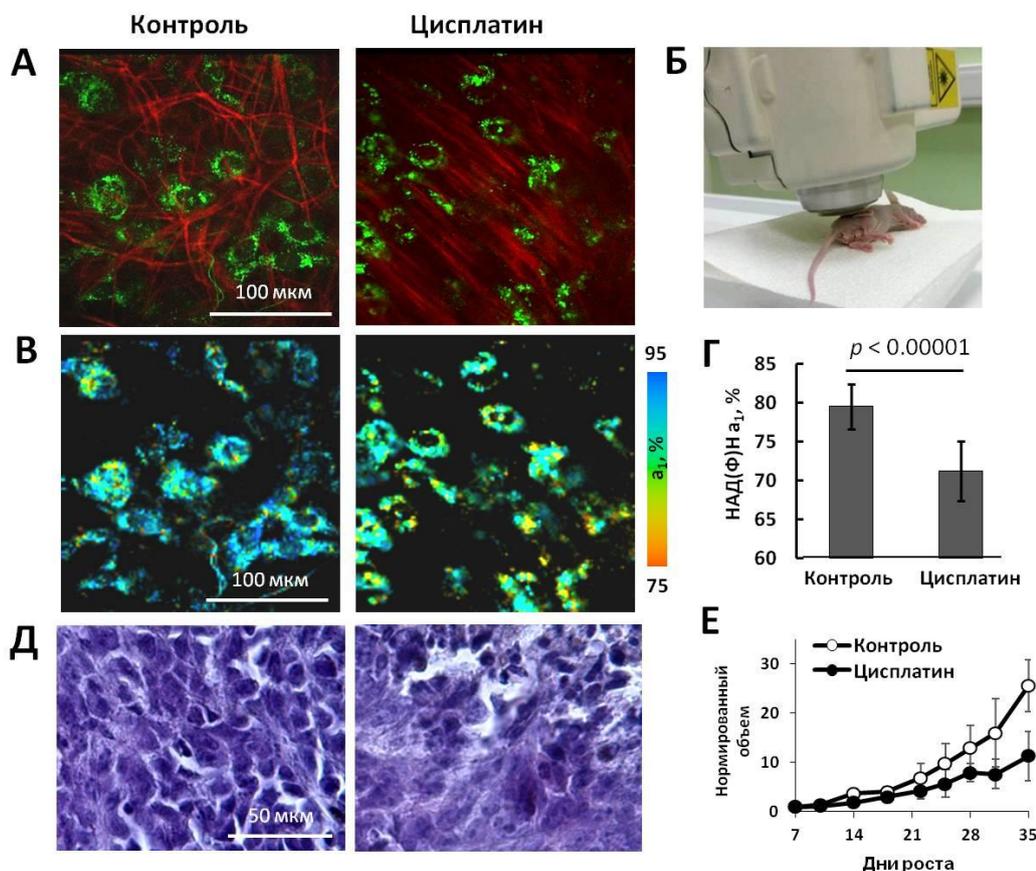


Рисунок 10. In vivo анализ энергетического метаболизма опухолевых ксенографтов HeLa с помощью FLIM НАД(Ф)Н после лечения цисплатином. А – Изображения интенсивности автофлуоресценции НАД(Ф)Н (зеленым) и сигнала генерации второй гармоники от коллагена (красным) в опухоли. Б – Фотография мыши nude во время эксперимента на многофотонном томографе MPTflex. В – FLIM-изображения НАД(Ф)Н в опухоли. Г – Относительный вклад свободной формы a_1 НАД(Ф)Н в контрольных и леченых опухолях. Среднее \pm SD. Д - Гистологические изображения контрольной и леченой опухолей. Окраска гематоксилином и эозином. Е – Графики роста опухолей в контрольной и леченой группах.

Метаболические изменения при химиотерапии таксолом, относящимся в классу антимиотических агентов, были исследованы на монослойных культурах, сфероидах и опухолях животных. Инкубация клеточной культуры HeLa с таксолом (IC_{50} 3.2 nM) приводила к увеличению редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н, увеличению среднего времени жизни τ_m и снижению вклада свободной формы НАД(Ф)Н a_1 [A13]. Характерно, что в погибающих клетках изменения параметров затухания появлялись раньше и были более выражены, чем в клетках, сохраняющих жизнеспособность, таким образом,

указывая на гетерогенность метаболического ответа в клеточной популяции. В модели многоклеточных опухолевых сфероидов HeLa воздействие таксолем привело, в целом, к схожим эффектам с монослойной культурой (рис. 11). Однако в клетках наружного слоя, которые исходно более активно пролиферируют и более гликоличны, изменения редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н, τ_m и a_1 НАД(Ф)Н были более выражены по сравнению с клетками внутреннего слоя. В опухолях мышей СТ26 снижение вклада свободной формы НАД(Ф)Н a_1 было зарегистрировано уже на 7-й день роста (3-й день после начала лечения), тогда как увеличение среднего времени жизни τ_m – с 14-го дня роста [A17]. Как и в случае цисплатина, изменения в кинетике флуоресценции НАД(Ф)Н в опухолях предшествовали морфологическим и размерным проявлениям терапевтического ответа.

Воздействие на клетки двух линий колоректального рака человека НСТ116 и НТ29 препаратом 5-фторурацил из группы антиметаболитов также приводило к увеличению фракции свободного НАД(Ф)Н a_1 и увеличению среднего времени жизни τ_m НАД(Ф)Н, что является индикатором сдвига баланса в сторону окислительного фосфорилирования [A37]. Интересно, что с увеличением дозы препарата с 2 до 25 мкМ (при IC50 4 мкМ для НСТ116 и 8 мкМ для НТ29) изменения параметров затухания флуоресценции становились более выраженными, таким образом, указывая на соответствие степени метаболического отклика клеточному ответу.

Эффекты доксорубина – химиопрепарата из класса антрациклиновых антибиотиков – на метаболизм опухолевых клеток Т24 (рак мочевого пузыря человека) в культуре отличались от других препаратов на ранних временах инкубации. Начиная с 1.5 ч, τ_m НАД(Ф)Н снижалось с 0.89 нс до 0.75 нс, а a_1 НАД(Ф)Н возрастало с 77.5% до 82.2% ($p < 0.0001$), что указывало на усиление гликолиза [A42]. Однако через 48 ч оставшиеся жизнеспособные клетки демонстрировали пониженные значения a_1 (76%, $p = 0.01$) по сравнению с контролем без воздействия, т.е. сдвиг на митохондриальное дыхание (рис. 12). Отличия эффектов доксорубина от других химиопрепаратов, которые не демонстрировали ранних изменений показателей затухания НАД(Ф)Н, по всей видимости, обусловлены нарушением митохондриальной функции под действием доксорубина. Подобные эффекты в виде быстрого снижения τ_m НАД(Ф)Н наблюдались нами [A38] и другими авторами [56, 87] при воздействии на опухолевые клетки ингибиторами клеточного дыхания.

Оценка метаболических изменений, индуцированных препаратом иринотекан (ингибитор топоизомеразы I), в клеточных культурах была невозможна, поскольку данный препарат обладает флуоресценцией спектрально пересекающейся с флуоресценцией НАД(Ф)Н. Однако это не было проблемой в исследовании на мышах *in vivo*, т. к. в условиях организма иринотекан метаболизируется в печени с образованием цитотоксичного продукта SN-38. *In vivo* в опухолях СТ26 при терапии иринотеканом

наблюдалось увеличение τ_m с 7-го дня роста и снижение a_1 НАД(Ф)Н с 14-го дня роста опухолей [A17]. Выраженные дистрофические нарушения в клетках опухолей и торможение роста отмечались также с 14-го дня.

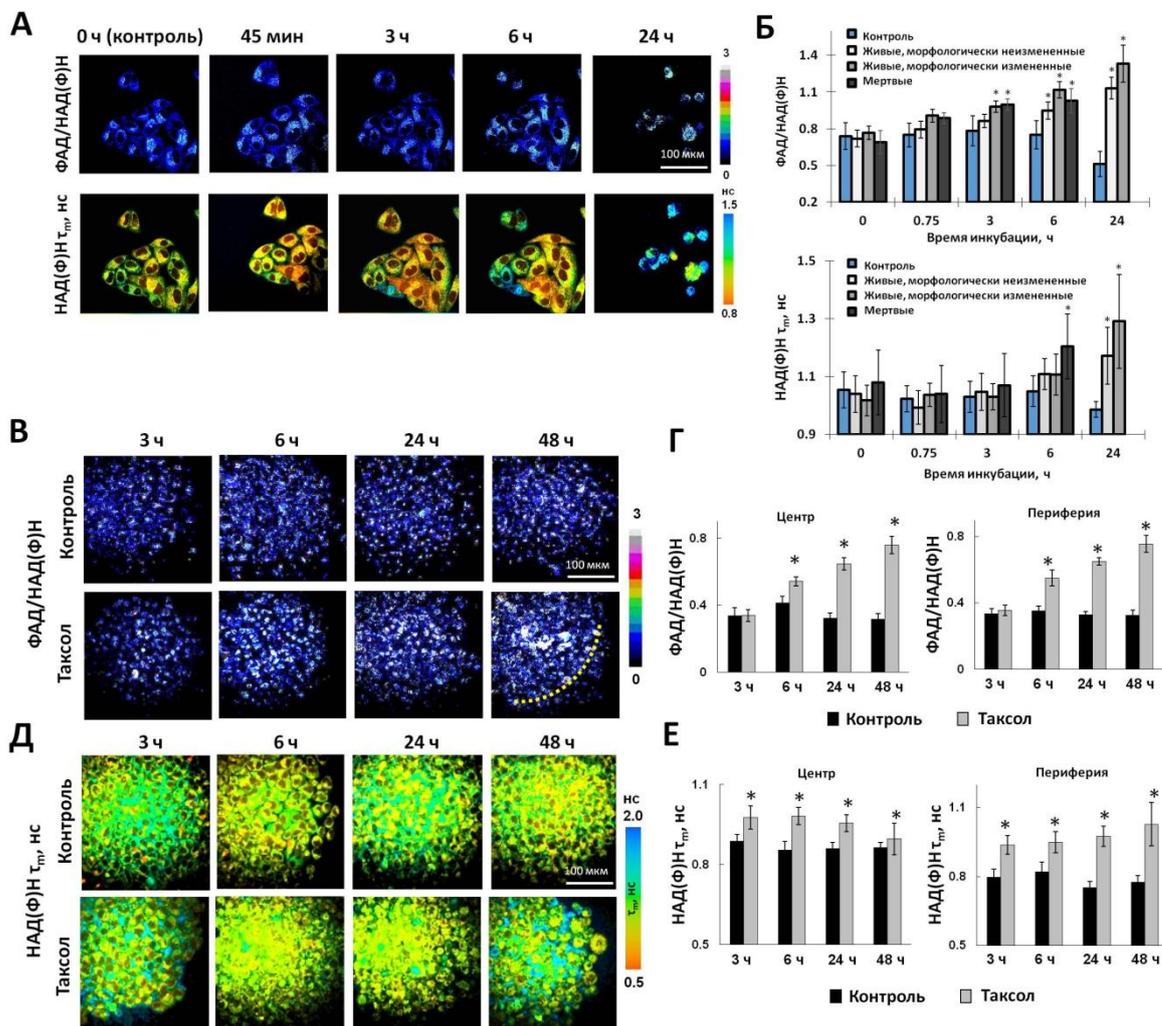


Рисунок 11. Эффекты таксола на редокс-отношение ФАД/НАД(Ф)Н и кинетику флуоресценции НАД(Ф)Н в опухолевых клетках рака шейки матки человека HeLa в монослойной культуре и сфероидов. А – Микроскопические изображения редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н и среднего времени жизни τ_m НАД(Ф)Н в клетках монослойной культуры в динамике до 24 ч инкубации с таксолом (IC50). Б – Значения редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н и τ_m НАД(Ф)Н в различных субпопуляциях клеток. В – Изображения редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н в опухолевых сфероидов в контроле без воздействия и в течение 48 ч инкубации с таксолом. Г - Значения редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н в клетках центральной и периферической зон сфероидов. Д – FLIM-изображения среднего времени жизни τ_m НАД(Ф)Н в контроле без воздействия и в течение 48 ч инкубации с таксолом. Е - Значения τ_m НАД(Ф)Н в клетках центральной и периферической зон сфероидов. Среднее \pm SD. *- $p < 0.05$ в сравнении с контролем на тот же день. Граница периферической и центральной зоны показана пунктирной линией на В.

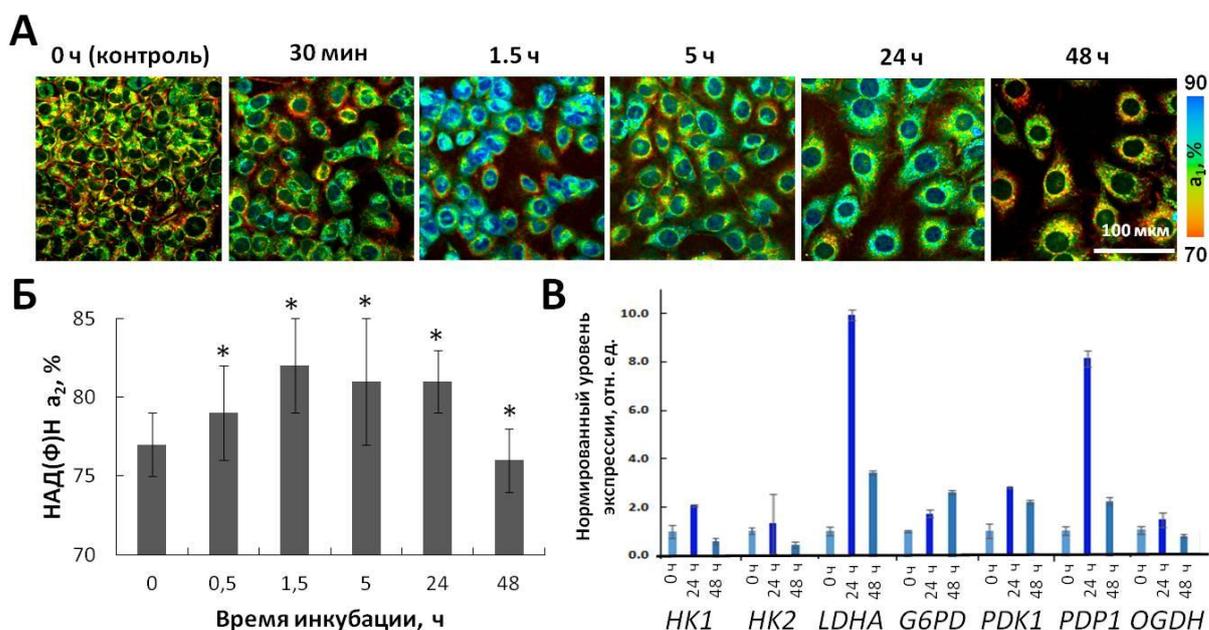


Рисунок 12. Изменение относительной фракции свободного НАД(Ф)Н в клетках монослойной культуры рака мочевого пузыря человека T24 под действием доксорубина. А – Микроскопические FLIM-изображения НАД(Ф)Н в клетках T24 при инкубации с доксорубином (IC50). Б – Относительный вклад свободной формы НАД(Ф)Н a_1 в клетках. Среднее \pm SD. *- $p < 0.05$ в сравнении с контролем (0 ч). В – Анализ экспрессии отдельных «метаболических» генов с помощью ПЦР в реальном времени в контроле, через 24 и 48 ч после добавления доксорубина. Уровень экспрессии нормирован на контроль.

Поскольку разные типы химиопрепаратов вызывают однонаправленные изменения в параметрах затухания флуоресценции НАД(Ф)Н, применение комбинации препаратов, соответствующих стандартному клиническому режиму FOLFOX (оксалиплатин, 5-фторурацил, лейковорин), на культуре опухолевых клеток HCT116 так же приводило к увеличению значений τ_m НАД(Ф)Н и снижению a_1 по сравнению с контрольными клетками без воздействия [A52].

Таким образом, *in vitro* и *in vivo* исследования на различных опухолевых моделях, полученных из опухолевых клеток различного гистогенеза, позволили установить, что изменения параметров затухания флуоресценции НАД(Ф)Н (снижение среднего времени жизни τ_m за счет увеличения относительной фракции свободного НАД(Ф)Н a_1), имеют схожий характер для химиопрепаратов с разными механизмами действия, не связанными с повреждением митохондрий. Эти изменения регистрируются методом FLIM-микроскопии в цитоплазме жизнеспособных клеток со сниженной в результате воздействия пролиферацией и указывают на активацию аэробного дыхания.

2.6.2 Химиотерапия первичных культур опухолевых клеток

Перспективным подходом к персонализированной химиотерапии считается прямое определение эффективности тестируемых препаратов на выделенном из опухоли пациента материале в условиях *in vitro* [A23, A53]. Однако в задаче по оценке лекарственной чувствительности опухолевых клеток сложным вопросом остается выбор метода анализа клеточного ответа на воздействие. Принимая во внимание высокую чувствительность, (суб)клеточное разрешение и возможность визуализации клеточной гетерогенности с помощью FLIM-микроскопии, данный метод рассматривается как хорошая альтернатива традиционным клеточным тестам на жизнеспособность.

Описанные выше результаты экспериментов на библиотечных клеточных линиях и опухолях животных убедительно доказали, что укорочение времени жизни флуоресценции τ_m кофактора НАД(Ф)Н, равно как и увеличение вклада короткой компоненты a_1 в затухание может выступать индикатором ответа на химиотерапию.

Следующим шагом в работе была апробация FLIM как метода оценки терапевтического ответа в первичных клеточных культурах, полученных из операционных образцов опухолей пациентов, что имеет высокое прикладное значение. Данные исследования были проведены на краткосрочных культурах колоректального рака и глиом.

В работе на культурах колоректального рака было показано, что воздействие 5-фторурацилом в дозе 2 мкМ приводит к статистически значимому увеличению τ_m НАД(Ф)Н у большинства культур, аналогично результатам на библиотечных линиях [A37]. Интересно, что эти культуры были исходно метаболически однородны по данным FLIM, тогда как культуры, не ответившие на воздействие даже удвоенной дозой (4 мкМ), были гетерогенны согласно значениям индекса бимодальности. Следует отметить, то ответ клеток пациентов на химиотерапию с помощью FLIM может быть оценен не только в первичных культурах, но и в переживающих срезах опухоли (опухолевых слайсах) [A44, A54]. Хотя этот способ предполагает более высокий выход пригодных для исследования образцов опухоли, сложная структура ткани и наличие стромальных клеток могут создавать трудности при анализе данных FLIM.

Исследования, описанные в наших публикациях [A46, A45], посвящены *in vitro* оценке чувствительности клеток глиом пациентов к темодалу, препарату из класса алкилирующих агентов, который является стандартом в лечении глиальных опухолей. С помощью FLIM НАД(Ф)Н установлено, что первичные культуры глиом исходно отличаются по значениям среднего времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н τ_m , которое коррелирует с пролиферативным индексом клеток по Ki67 ($r = -0.87$). Вариации τ_m между культурами от разных опухолей составляли от 0.6 до 0.8 нс, τ_2 от 1.9 до 2.3 нс, a_1 от 75 до 78%. Воздействие темодалом в дозе 1500 мкМ приводило к увеличению τ_m за счет снижения фракции свободного НАД(Ф)Н a_1 и/или

увеличения времени жизни флуоресценции белок-связанной формы τ_2 . Степень выраженности изменений была различной в разных культурах, свидетельствуя о межопухолевой гетерогенности ответа (рис. 13). Из трех параметров затухания, демонстрирующих изменения (τ_2 , τ_m , a_1), τ_m показал наиболее высокую корреляцию с выживаемостью клеток по данным МТТ-теста ($r = -0.93$, $p = 0.003$) и пролиферацией ($r = -0.92$, $p = 0.003$) после воздействия. Интересно, что клеточные культуры, демонстрирующие слабый ответ или отсутствие ответа на темодал, характеризовались исходно более короткими значениями τ_m , т.е. предположительно, были более гликолитичны.

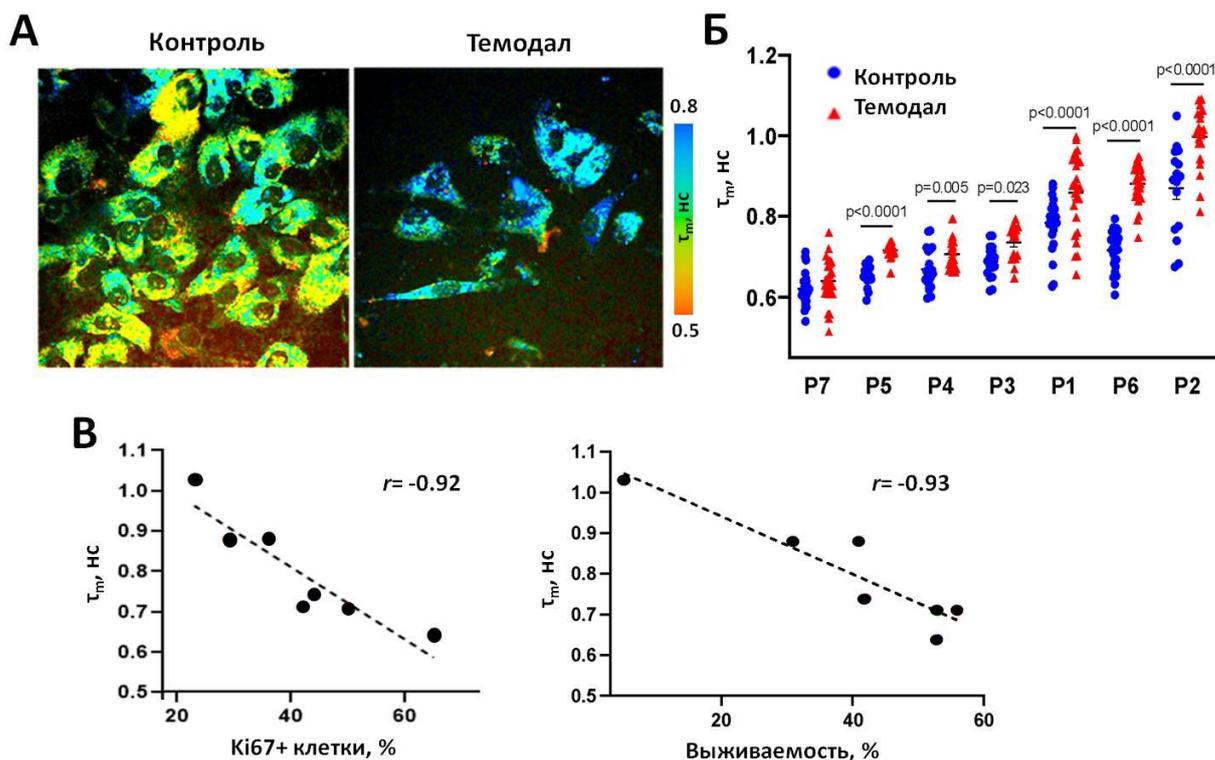


Рисунок 13. Оценка чувствительности первичных культур глиом к темодалу с помощью FLIM-микроскопии НАД(Ф)Н. А - FLIM-изображения НАД(Ф)Н в клетках без воздействия (контроль) и после воздействия темодалом (1500 мкМ, 72 ч инкубации), культура P1, выделенная из рецидивной глиобластомы (Grade IV, IDH-mut) пациента. Б – Анализ среднего времени жизни флуоресценции τ_m НАД(Ф)Н в выборке из 7 клеточных культур (P1-P7). Точки – измерения в индивидуальных клетках. В – Корреляция τ_m НАД(Ф)Н с индексом пролиферации по Ki67 и выживаемостью клеток после воздействия темодалом. Точки – средние значения по каждой клеточной культуре.

Результаты этих работ на опухолевых клетках, выделенных из опухолей пациентов, указывают на перспективу использования FLIM-микроскопии НАД(Ф)Н как метода анализа клеточного ответа на химиотерапию при тестировании лекарственной чувствительности.

2.7 Метаболический ответ опухолевых клеток на ФДТ по данным FLIM

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой современный метод лечения онкологических заболеваний, основанный на применении

фоточувствительных соединений – фотосенсибилизаторов, которые при взаимодействии со светом генерируют активные формы кислорода, токсичные для опухолевых клеток [88]. Актуальной проблемой в ФДТ, как и в других видах противоопухолевой терапии, является поиск предиктивных индикаторов, которые позволяли бы оценивать целесообразность назначения данного вида терапии, а также проводить мониторинг раннего ответа опухоли на лечение. Тем не менее, до конца не ясно, какие из биологических эффектов ФДТ или характеристик опухоли могут выступать в роли предиктивных показателей.

Имеются данные о том, что гликолитические опухоли устойчивы к ФДТ, а фармакологическое ингибирование гликолиза повышает ее эффективность [89-91]. В некоторых случаях ФДТ снижает уровень АТФ в результате повреждения митохондрий, что имеет большое значение для индукции цитотоксических эффектов [92, 93]. Предполагается, что метаболический ответ опухоли зависит от механизмов ФДТ и отличается для клеточной и сосудистой разновидностей терапии [94]. Так, например, при ФДТ с преимущественно клеточным механизмом действия характерно быстрое снижение поглощения глюкозы с последующим быстрым восстановлением почти до исходного уровня по окончании облучения. При сосудистой ФДТ отмечалось отсроченное снижение уровня глюкозы и восстановление до значительно меньшего уровня после облучения. В то же время, гипоксичная среда в опухоли и окислительный стресс после ФДТ способствуют активации молекулярных путей, ведущих к выживанию более агрессивных опухолевых клеток [95]. В целом, значение состояния биоэнергетики клеток опухоли для ФДТ и ее изменения в процессе ФДТ мало изучены.

2.7.1 FLIM НАД(Ф)Н при ФДТ с генетически кодируемым фотосенсибилизатором KillerRed

Новым типом фотосенсибилизаторов являются генетически кодируемые фототоксичные белки. Идея генетически кодируемого фотосенсибилизатора состоит в том, что опухолевая клетка несет ген, отвечающий за синтез фотоактивного соединения. В результате, фотосенсибилизатор вырабатывается самой клеткой, что обеспечивает исключительную селективность и специфичность воздействия на клетку. При этом фотосенсибилизатор экспрессируется в заданной локализации, что исключает вероятность его перераспределения внутри клетки или ткани. На сегодняшний день наиболее изученным фотосенсибилизатором такого типа является KillerRed – красный белок семейства GFP (возб. 585 нм, эм. 610 нм), который при облучении желтым светом генерирует АФК в фотодинамической реакции I типа (электрон-трансферный процесс) [96].

Нами впервые показано, что фототоксичный белок KillerRed способен стабильно экспрессироваться и проявлять противоопухолевую активность в модельных опухолях мышей [А3, 97-99]. Однако для достижения

терапевтического эффекта требовалось многократное ($\times 7$) и достаточно интенсивное облучение опухолей (150 мВт/см^2 , 270 Дж/см^2), что говорило о необходимости оптимизации режимов воздействия. В работах [A1, A2] проводилось сравнение эффективности непрерывного и импульсно-периодического режимов для ФДТ с белком KillerRed, экспрессирующемся во фьюзе с гистоновым белком H2B. На опухолевых сфероидах было установлено, что степень фотовыгорания белка напрямую зависит от дозы облучения в широком диапазоне световых доз. При этом импульсный режим вызывал преимущественно апоптотическую гибель клеток, тогда как непрерывный режим приводил к некрозу. Схожие результаты нами были получены в модели опухолевых сфероидов, экспрессирующих другой фототоксичный белок miniSOG [A30]. Эксперименты на опухолях СТ26 (колоректальный рак мыши), локализованных подкожно на бедре животного, показали более высокую эффективность импульсно-периодического режима (584 нм , 225 мВт/см^2 , 337 Дж/см^2 , $\times 3$) при ФДТ с KillerRed, что, скорее всего, было обусловлено более высокой световой энергией, доставляемой к опухолевым клеткам, без возникновения температурных эффектов [A1]. В другом эксперименте на опухолях СТ26, локализованных внутрикожно на ухе мыши, нам удалось добиться противоопухолевого эффекта при ФДТ в непрерывном режиме при более интенсивном воздействии (593 нм , 170 мВт/см^2 , 306 Дж/см^2 , $\times 5$). Данный режим вызывал торможение роста опухолей на 44% к 5-му дню после ФДТ и выраженные патоморфологические изменения в виде обширного некроза и признаков дистрофии в живых клетках (нарушение целостности мембран, конденсации хроматина, клеточного отека, размытием клеточных границ). Принимая во внимание высокую интенсивность и кратность облучения, а также необходимость генетической модификации опухолевых клеток, генетически кодируемый фотосенсибилизатор KillerRed пока не может рассматриваться для клинических приложений ФДТ, но при этом может служить хорошим инструментом для изучения механизмов клеточной ФДТ в экспериментах.

Разработанные методики ФДТ с KillerRed были использованы при изучении изменений в путях энергетического обмена. Благодаря тому, что пики возбуждения и эмиссии KillerRed лежат в желтой области спектра (возбуждение 585 нм , эмиссия 610 нм) и не пересекаются со спектральными характеристиками кофактора НАД(Ф)Н, мы могли проводить оценку кинетики флуоресценции НАД(Ф)Н в клетках, экспрессирующих KillerRed.

Облучение сфероидов, экспрессирующих KillerRed-H2B, проводили непрерывным лазером в режиме: 593 нм , 50 мВт/см^2 , 25 мин, 75 кДж/см^2 на 7-й день роста (размер $\sim 300 \text{ мкм}$). Обнаружено, что в клетках периферических слоев сфероида вклад свободного НАД(Ф)Н a_1 увеличивается спустя 24 ч после облучения по сравнению с необлученным контролем. В клетках центральной зоны a_1 НАД(Ф)Н увеличивался раньше - спустя 6 ч после облучения, и сохранялся на повышенном уровне до 24 ч. Рост НАД(Ф)Н a_1 в затухании флуоресценции свидетельствует о

переключении опухолевых клеток на гликолиз, что вполне ожидаемо после ФДТ в связи с расходом кислорода на фотодинамические реакции.

ФДТ опухолей СТ26, локализованных на ухе животных, проводили в непрерывном режиме лазера при следующих параметрах: 593 нм, 170 мВт/см², 306 Дж/см², x5 (с 9 по 13 дни роста). Через 3 ч в после ФДТ обнаружены повышенные значения a_1/a_2 НАД(Ф)Н (4.38 ± 0.17 vs. 3.79 ± 0.05 , $p = 0.011$), которые не менялись в течение 24 ч. Через 48 ч и 5 дней после ФДТ значения a_1/a_2 были статистически значимо ниже контроля (рис. 14). Наблюдаемые изменения указывают на то, что минимум до 6 ч после ФДТ опухолевые клетки имели более гликолитический метаболизм по сравнению с необлученным контролем. Начиная с 48 ч после ФДТ метаболизм леченых опухолей был сдвинут в сторону окисления, что коррелирует с замедлением опухолевого роста и обычно наблюдается в жизнеспособных клетках с пониженной пролиферацией.

2.7.2 FLIM НАД(Ф)Н при ФДТ с фотодитазином

Фотодитазин – широко применяемый в клинике фотосенсибилизатор хлоринового ряда (N-диметилглюкаминная соль хлорина е6). Методики ФДТ с фотодитазином *in vitro* и *in vivo* отработаны нами в предварительных исследованиях и опубликованы [A14, A33, A56].

ФДТ проводили на мышинной модели опухоли СТ26. Препарат вводили мышам внутривенно в дозе 5 мг/кг, облучение проводили через 15 мин после введения в режиме: 658 нм, 100 мВт/см², 16.6 мин, 100 Дж/см². Лечение начинали на 7 день роста, когда размер опухолей составлял ~3-4 мм³. Регистрацию флуоресценции НАД(Ф)Н проводили через 3, 6, 24, 48 часов и 5 дней после ФДТ.

Анализ отношения относительных вкладов свободной к связанной с белком формам НАД(Ф)Н (a_1/a_2) показал, что в контрольных нелеченых опухолях значение a_1/a_2 НАД(Ф)Н увеличивалось в процессе их роста с 2.52 ± 0.05 до 3.45 ± 0.13 , что указывает на повышение интенсивности гликолиза. Все опухоли в группе лечения уже через 3 ч после ФДТ имели сниженные значения a_1/a_2 НАД(Ф)Н по сравнению с контролем (рис. 15). При дальнейшем наблюдении в течение 5 дней отличия от контроля в виде увеличения вклада связанной формы НАД(Ф)Н a_2 становились более выраженными, что может быть связано как с повышением активности митохондриального дыхания (например, в условиях реоксигенации ткани), так и с блокировкой процесса переноса электронов по дыхательной цепи и увеличением пула восстановленного НАДН.

Таким образом, с помощью метода FLIM НАД(Ф)Н нами впервые получены данные об изменениях в энергетическом метаболизме опухолей, вызванных ФДТ с высокоселективным клеточным (KillerRed) и с преимущественно сосудистым механизмами действия (фотодитазин) [A59].

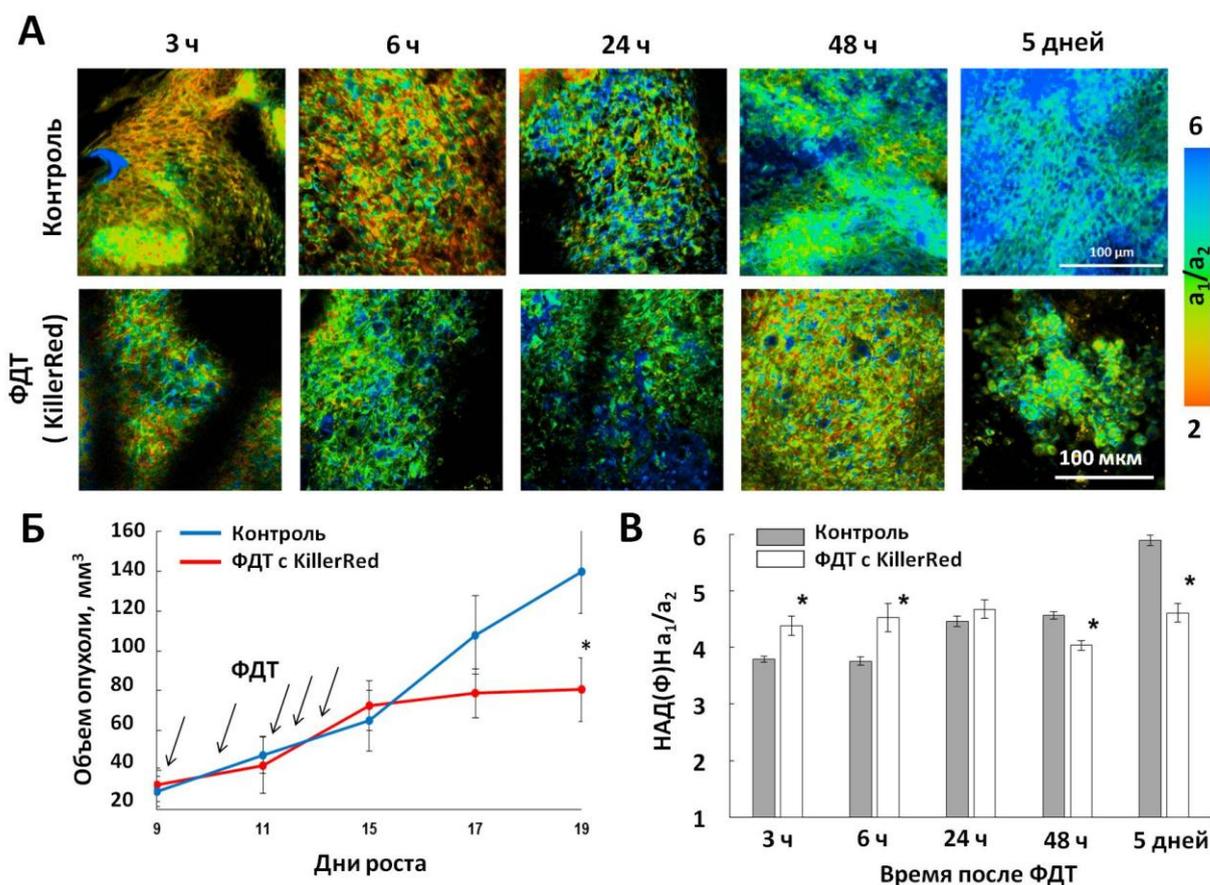


Рисунок 14. In vivo FLIM-микроскопия НАД(Ф)Н опухолей мышей СТ26 после ФДТ с генетически кодируемым фотосенсибилизатором KillerRed. А – FLIM-изображения опухоли в контроле без лечения и после ФДТ в динамике. Б – Графики роста опухолей в контрольной и леченой группах. Стрелками показаны сеансы ФДТ. В – Значения отношения свободной/связанной форм НАД(Ф)Н a_1/a_2 в опухолях контрольной и леченой групп. Среднее \pm SEM, $n =$ от 4 до 10 опухолей. * - $p \leq 0.05$ в сравнении с контролем в той же временной точке.

2.8 Взаимосвязь энергетического метаболизма и кислородного статуса опухолевых клеток по данным FLIM и PLIM

Гипоксия – характерный признак многих солидных опухолей, развивается в результате дисбаланса между поступлением и потреблением кислорода в ткани. Считается, что уровень кислорода в гипоксичных опухолях ниже, чем в соответствующих нормальных тканях, и в среднем составляет 1-2% O_2 (7.5-15 мм.рт.ст.) и ниже [100]. Основными факторами развития гипоксии в опухоли являются атипичная структура микрососудов, большие расстояния между кровеносными сосудами и опухолевыми клетками, что ограничивает поступление кислорода путем диффузии, а также пониженный транспорт кислорода кровью в связи с анемией. Многочисленные исследования последних двух десятилетий показали, что гипоксия играет существенную роль в опухолевой прогрессии и является неблагоприятным прогностическим фактором эффективности лечения, обеспечивая устойчивость к химио-, лучевой- и фотодинамической терапии.

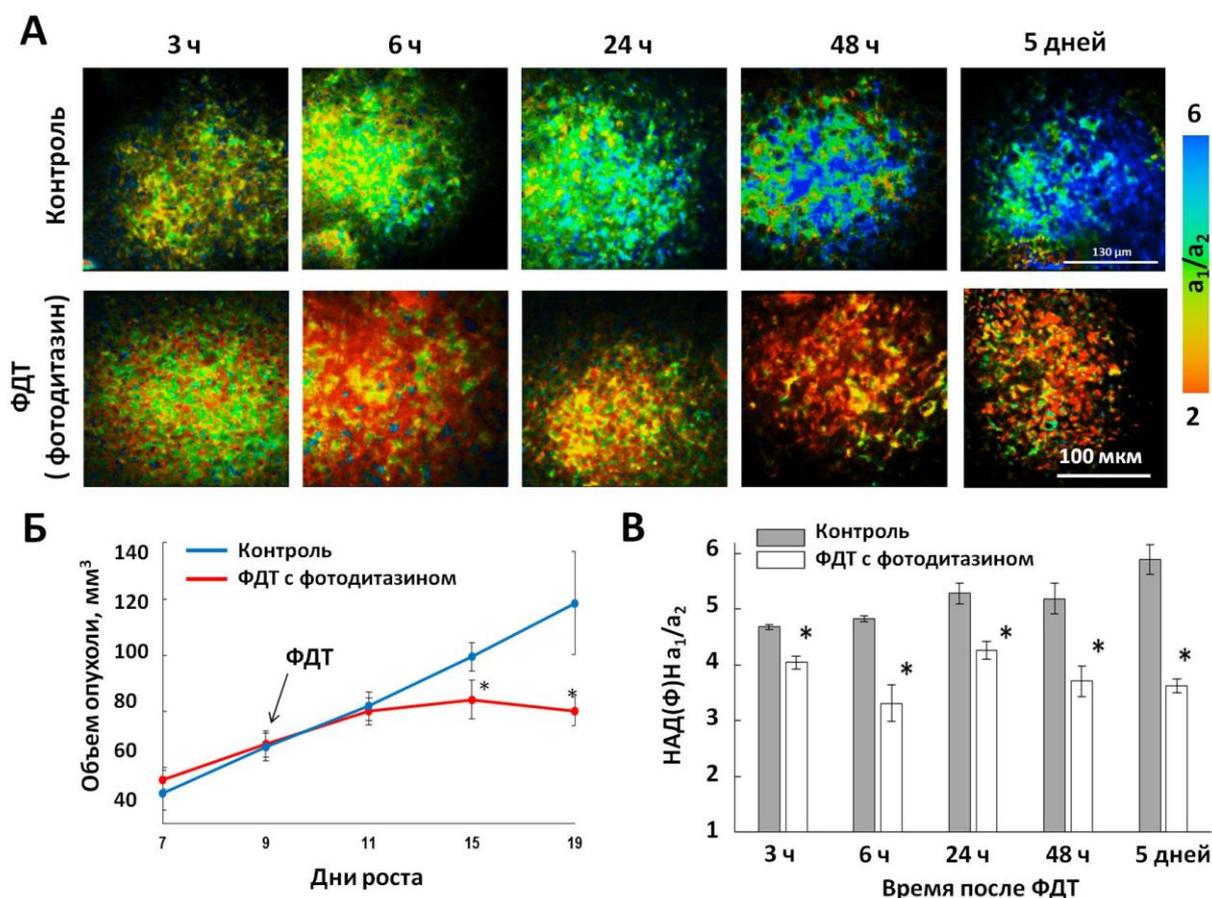


Рисунок 15. In vivo FLIM-микроскопия НАД(Φ)Н в опухолях мышей СТ26 после ФДТ с фотодитазинном. А – FLIM-изображения опухоли в контроле без лечения и после ФДТ в динамике. Б – Графики роста опухолей в контрольной и леченой группах. Стрелкой показан сеанс ФДТ. В – Значения отношения свободной/связанной форм НАД(Φ)Н a_1/a_2 в опухолях контрольной и леченой групп. Среднее \pm SEM, $n =$ от 3 до 10 опухолей. * - $p \leq 0.05$ в сравнении с контролем в той же временной точке.

Содержание кислорода в опухоли является существенным фактором регуляции энергетического метаболизма [101]. В условиях гипоксии митохондриальное дыхание становится невозможным, что вынуждает клетки активировать гликолитический путь получения АТФ. В то же время известно, что в опухолевых клетках гликолиз может использоваться в качестве основного биоэнергетического пути даже при наличии нормального содержания кислорода (аэробный гликолиз, или эффект Варбурга). Хотя гликолиз, как анаэробный так и аэробный, считается ключевой метаболической особенностью опухолевых клеток, роль митохондриального дыхания в производстве АТФ остается значительной для некоторых типов рака [102]. Так что отношения между оксигенацией и метаболизмом опухоли имеют непростой характер. Ситуация осложняется тем, что распределение кровеносных сосудов и, соответственно, кислорода в опухоли гетерогенно, а на энергетический метаболизм опухолевых клеток, помимо кислорода, влияют многие факторы, относящиеся как к самим опухолевым клеткам, так и к опухолевому микроокружению.

В целом, роль кислорода в регуляции биоэнергетики опухолевой клетки на сегодняшний день до конца не установлена. В числе основных направлений современных исследований в данной области остаются изучение молекулярных и метаболических механизмов ответа опухолей на изменение уровня оксигенации, а также развитие новых и совершенствование существующих методов оценки кислородного статуса опухолей. Работы по изучению оксигенации опухолей методами фосфоресцентного имиджинга с временным разрешением PLIM единичны, что обуславливает необходимость разработки соответствующих методик.

2.8.1 Методики комбинированной оценки фосфоресценции кислородных сенсоров и автофлуоресценции НАД(Ф)Н в опухолях с помощью PLIM и FLIM

При работе с животными был отработан способ локального внутритканевого введения кислород-чувствительных фосфоресцентных сенсоров NanO₂, ВTPDM1 и PIr3, поскольку NanO₂ не пригоден для системного введения по данным производителя, а ВTPDM1 и PIr3 слабо накапливаются в опухоли при системном введении.

Для получения опухолей мышам подкожно в область бедра или ушной раковины вводили клетки СТ26. Животное с развитой опухолью наркотизировали непосредственно перед исследованием смесью золетила и 2% рометара.

Оптоволоконная флуоресцентная/фосфоресцентная спектроскопия. Использована оригинальная установка для однофотонной флуоресцентной и фосфоресцентной спектроскопии с временным разрешением (Becker&Hickl, Германия). Работа проводилась на опухолях СТ26, локализованных на бедре. Раствор сенсора ВTPDM1 (12 мкМ, 84 мкг/мл физраствора, 1% ДМСО) вводился непосредственно в опухоль с помощью инсулинового шприца (250 мкл раствора, 4-5 инъекцией в разные участки опухоли) за 20 мин до проведения измерений. Игольчатый зонд вводили в опухоль на глубину около 2 мм и регистрировали фосфоресценцию. Для регистрации фосфоресценции ВTPDM1 в опухолях мышей были подобраны следующие настройки: сигнал возбуждали с помощью пикосекундного лазера BDL-488-SMC (Becker&Hickl, Германия) на длине волны 488 нм, принимали в диапазоне 587-677 нм, время сбора фотонов составляло 30 с, мощность возбуждающего излучения составляла 10 мкВт. С каждой опухоли размером не менее 7 мм делали 5-7 измерений с разных участков. Аналогичные измерения проводили с мышцы на противоположном бедре для тестового сравнения с опухолью. Значения времени жизни фосфоресценции τ составили 4.07 ± 0.22 мкс в опухолевой и 3.53 ± 0.19 мкс ($p=0.03$) в нормальной ткани, что указывает на сниженное содержание кислорода в опухоли по сравнению с мышцей [A11], что было подтверждено ИГХ с пимонидазолом.

Время-разрешенная спектроскопия предполагает введение игольчатого зонда в ткань для проведения измерений, а локальная инъекция сенсора

приводит к дополнительной травматизации опухоли. Поэтому нами был апробирован также способ введения сенсора путем нанесения раствора на торец волокна. Игольчатый зонд опускали в раствор сенсора NanO2 solution (100 мкг/мл) непосредственно перед введением зонда в ткань [A26]. Фосфоресценцию NanO2 возбуждали с помощью пикосекундного лазера на длине волны 405 нм, принимали в диапазоне 587-677 нм, время сбора фотонов 60 с. При использовании NanO2 времена жизни фосфоресценции составили 52.3 ± 6.3 мкс для опухолевой ткани и 42.6 ± 2.8 мкс ($p=0.001$) для мышцы.

Иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание пимонидазолом продемонстрировало наличие гипоксичных зон, неравномерно распределенных по опухолевому образцу, и отсутствие гипоксии в мышечной ткани, что подтверждает корректность данных, полученных с помощью фосфоресцентной время-разрешенной спектроскопии.

Наряду с фосфоресценцией NanO2 были проведены измерения времен жизни флуоресценции НАД(Ф)Н в опухолевой и мышечной ткани через тот же игольчатый зонд. Флуоресценцию кофактора возбуждали на длине волны 375 нм пикосекундным лазером (Becker&Hickl, Германия) и регистрировали в диапазоне 420-500 нм. Мощность возбуждающего излучения составляла 25 мкВт. Измерения показали, что среднее время жизни флуоресценции НАД(Ф)Н в опухоли было значительно короче, чем в мышечной ткани: 1.019 ± 0.72 нс и 1.82 ± 0.72 нс, соответственно ($p=0.0007$). Относительный вклад свободного НАД(Ф)Н a_1 составлял $84.3 \pm 1.5\%$ в опухоли и $78.4 \pm 2.2\%$ в мышце ($p=0.03$). Более короткие времена жизни НАД(Ф)Н и более высокий вклад его свободной формы в опухоли, как правило, обусловлены более гликолитическим метаболизмом по сравнению с большинством нормальных тканей. Таким образом, результаты оценки метаболического и кислородного статуса тканей согласуются между собой.

FLIM/PLIM макроимиджинг. Для получения PLIM-изображений опухолей *in vivo* использован оригинальный двухканальный конфокальный FLIM/PLIM макросканер (Becker&Hickl, Германия). В качестве кислород-чувствительного фосфоресцентного сенсора использован комплекс ВТРДМ1. Для имиджинга фосфоресценции ВТРДМ1 в опухолях мышей СТ26 были подобраны следующие настройки: фосфоресценцию возбуждали в однофотонном режиме на длине волны 488 нм с помощью пикосекундного лазера BDL-488-SMC (Becker&Hickl, Германия), детектировали в диапазоне 608-682 нм, мощность возбуждающего излучения была 10 мкВт. Время сбора фотонов порядка 90 с. Раствор сенсора ВТРДМ1 (12 мкМ) вводили в опухоль локально с помощью инсулинового шприца, имиджинг проводили через 20-30 мин после инъекции сенсора. При работе с опухолями на ухе, имеющими поверхностный рост, имиджинг проводится чрезкожно, количество микроинъекций на 1 опухоль 2-3 по 30-50 мкл. С помощью данной методики неинвазивно были получены PLIM-изображения мышечных опухолей СТ26 *in vivo*.

in vivo. Времена жизни фосфоресценции составляли в среднем ~ 3.9 мкс, что соответствует величинам, регистрируемым при гипоксии [76].

Макро-PLIM был использован нами для *in vivo* тестирования новых кислород-чувствительных красителей на основе полимерных (полиноборборненовых) мицелл с Ir(III). Были подобраны условия регистрации фосфоресценции и оценены времена жизни в опухоли СТ26, локализованной на бедре животного, и в мышце после локального введения сенсора. Отметим, что для эффективной регистрации сигнала фосфоресценции в опухоли, растущей подкожно на бедре, требуется хирургическое открывание кожного лоскута над опухолью непосредственно перед имиджингом. Полученные времена жизни фосфоресценции лежали в диапазоне 0.84-1.45 мкс и в опухолях были длиннее, чем в мышце ($p=0.02$) [A32]. Сниженный по сравнению с мышцей уровень оксигенации опухоли подтвержден данными ИГХ с пимонидазолом. С этими результатами согласуются результаты *in vivo* измерений времен жизни флуоресценции НАД(Ф)Н в опухоли мышцей СТ26 и мышце, полученные на той же установке и указывающие на более интенсивный гликолиз в опухоли по сравнению с нормальной тканью [A15].

FLIM/PLIM-микроскопия. Эксперименты выполнены на лазерном сканирующем микроскопе LSM 880 (Carl Zeiss, Германия). Для кислородных измерений использован сенсор на основе полимерных мицелл с Ir(III) PIr3 [A40]. Опухолевые клетки *in vitro* инкубировали в присутствии сенсора в концентрации 10 мкМ 3 ч. В опухоль мыши, локализованную на ухе, раствор сенсора (10 мкМ) вводили локально, 10-20 мкл за 3-4 инъекции в разные зоны опухоли. FLIM НАД(Ф)Н и PLIM PIr3 проводили через 20-30 мин после инъекции сенсора. Флуоресценция и фосфоресценцию возбуждали одновременно на длине волны 750 нм. Флуоресценцию регистрировали в диапазоне 450-490 нм, фосфоресценцию - 570-640 нм. Время сбора сигнала составляло 120 с в исследовании *in vitro*, 180 с - *in vivo*.

Одновременный имиджинг НАД(Ф)Н и PIr3 в клеточной культуре СТ26 показал, что при моделировании гипоксии наложением покровного стекла на клеточный монослой наблюдается увеличение вклада свободной формы НАД(Ф)Н a_1 в клетках – индикатор переключения на гликолиз, и времен жизни фосфоресценции кислородного сенсора τ_{ph} – индикатор снижения концентрации кислорода [A40]. Времена жизни сенсора в клетках варьировали от 1.19 ± 0.02 мкс в нормоксии (21% O₂) до 2.14 ± 0.02 мкс в гипоксии ($\sim 0.1\%$ O₂) (рис. 16). При этом изменения метаболизма и содержания кислорода на уровне индивидуальных клеток хорошо коррелировали между собой ($r=0.73$). В опухолях животных *in vivo* отмечалась внутриопухолевая гетерогенность в распределении кислорода, а корреляция НАД(Ф)Н a_1 и τ_{ph} была ниже ($r=0.56$), что говорит о влиянии иных, помимо кислорода, факторов на энергетический метаболизм опухолевых клеток *in vivo*. При этом метаболическая гетерогенность была наиболее выражена в опухолях более крупного размера, где одновременно

присутствовали участки нормоксии и гипоксии. Гетерогенное распределение кислорода в опухолях было нами также показано в другом эксперименте *in vivo* на опухолях СТ26 с новым сенсором Ir1 [A50].

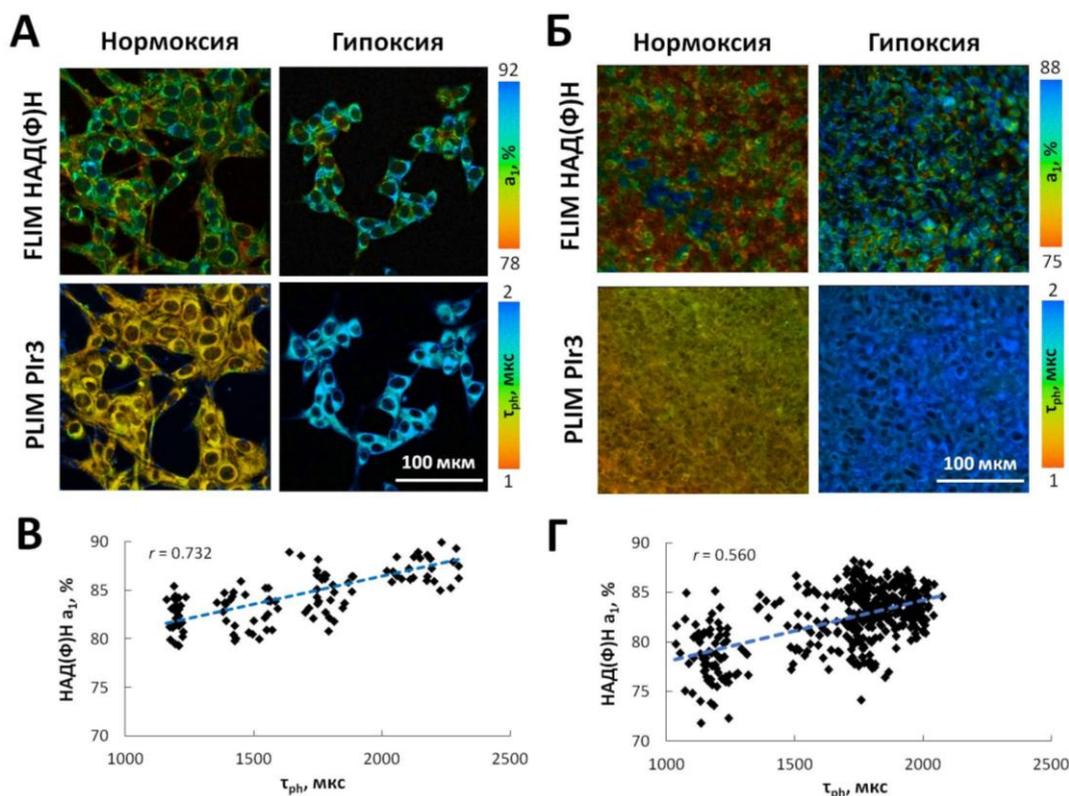


Рисунок 16. Одновременный имиджинг флуоресценции НАД(Ф)Н и фосфоресценции кислородного сенсора PIr3 в клетках колоректального рака мыши СТ26 *in vitro* и *in vivo* методом FLIM/PLIM-микроскопии. А – Репрезентативные FLIM и PLIM изображения клеточной культуры СТ26 в условиях нормоксии и гипоксии. Б - Репрезентативные FLIM и PLIM изображения *in vivo* опухоли мышей СТ26 в участках нормоксии и гипоксии. В – Корреляция вклада свободной формы НАД(Ф)Н a_1 с временем жизни фосфоресценции кислородного сенсора PIr3 τ_{ph} в клеточной культуре. Г - Корреляция НАД(Ф)Н a_1 и PIr3 τ_{ph} в клетках опухоли. Точки – значения параметров в отдельных клетках.

Таким образом, нами продемонстрированы возможности время-разрешенной фосфоресцентной спектроскопии, макро-имиджинга и микроскопии для оценки содержания кислорода в тканях экспериментальных животных *in vivo*. Разработаны подходы к одновременному прижизненному изучению энергетического метаболизма и кислородного статуса опухолей *in vivo* на основе регистрации автофлуоресценции НАД(Ф)Н и фосфоресценции кислород-чувствительных красителей.

2.8.2 PLIM и FLIM при химиотерапии и ФДТ

Время-разрешенная спектроскопия опухолей при химиотерапии. Методом время-разрешенной спектроскопии нами было выполнено одновременное *in vivo* исследование кислородного статуса и энергетического метаболизма опухолей мышей при химиотерапии иринотеканом. Была

использована схема лечения 20 мг/кг, внутривенно, 5 дней, со 2-го дня после прививки опухоли. Спектроскопическое исследование проводилось на ранних сроках - через 1, 4, 8 дней - после окончания сеанса терапии с целью идентификации раннего ответа опухоли на лечение.

С применением сенсора NanO₂ было обнаружено, что времена жизни фосфоресценции сенсора в леченых опухолях статистически значимо выше по сравнению с нелечеными опухолями (29.6 vs. 38.5, $p=0.05$) уже через 1 день после окончания терапии (7-й день роста опухоли) (рис. 17). На этом сроке леченые опухоли не отличались по размерам от нелеченых, но по данным патоморфологического анализа имели дистрофические клеточные изменения. Повышенное время жизни свидетельствует в пользу вызванной терапией гипоксии в ткани новообразования, что было подтверждено ИГХ с пимонидазолом. Гипоксический статус леченых опухолей сохранялся на протяжении всего срока наблюдения, однако к 14 дню роста был менее выражен. Развитие гипоксии под действием иринотекана было вызвано его антиангиогенным эффектом, что было показано ИГХ окрашиванием на маркер сосудов CD31 [A26]. Снижение оксигенации опухоли за счет антиангиогенного действия иринотекана установлено впервые.

По данным время-разрешенной спектроскопии НАД(Ф)Н отмечалось снижение вклада свободной формы a_1 в леченых опухолях по сравнению с нелечеными опухолями ($85.3 \pm 2.4\%$ vs. $81.8 \pm 3.8\%$, $p=0.002$) и увеличение среднего времени жизни τ_m (0.71 ± 0.04 vs. 0.80 ± 0.07 , $p < 0.0001$) через 8 дней после окончания терапии (14-й день роста опухоли), что указывает на переход с более гликолитического на более окислительный метаболизм. Эти результаты согласуются с данными FLIM-микроскопии [A17].

Таким образом, было показано, что на ранних сроках лечения иринотеканом энергетический метаболизм опухолей не изменяется, несмотря на снижение оксигенации. Дальнейший переход на окислительное фосфорилирование наблюдается на фоне компенсации гипоксического состояния и, вероятно, связан с ингибированием опухолевого роста.

Макро-PLIM и FLIM-микроскопия при ФДТ. С помощью макро-PLIM и кислородного сенсора BPTDM1 выполнено исследование содержания кислорода в опухолевой ткани животных *in vivo* после ФДТ с двумя типами фотосенсибилизаторов – генетически кодируемым белком KillerRed и химическим фотосенсибилизатором фотодитазин [A59].

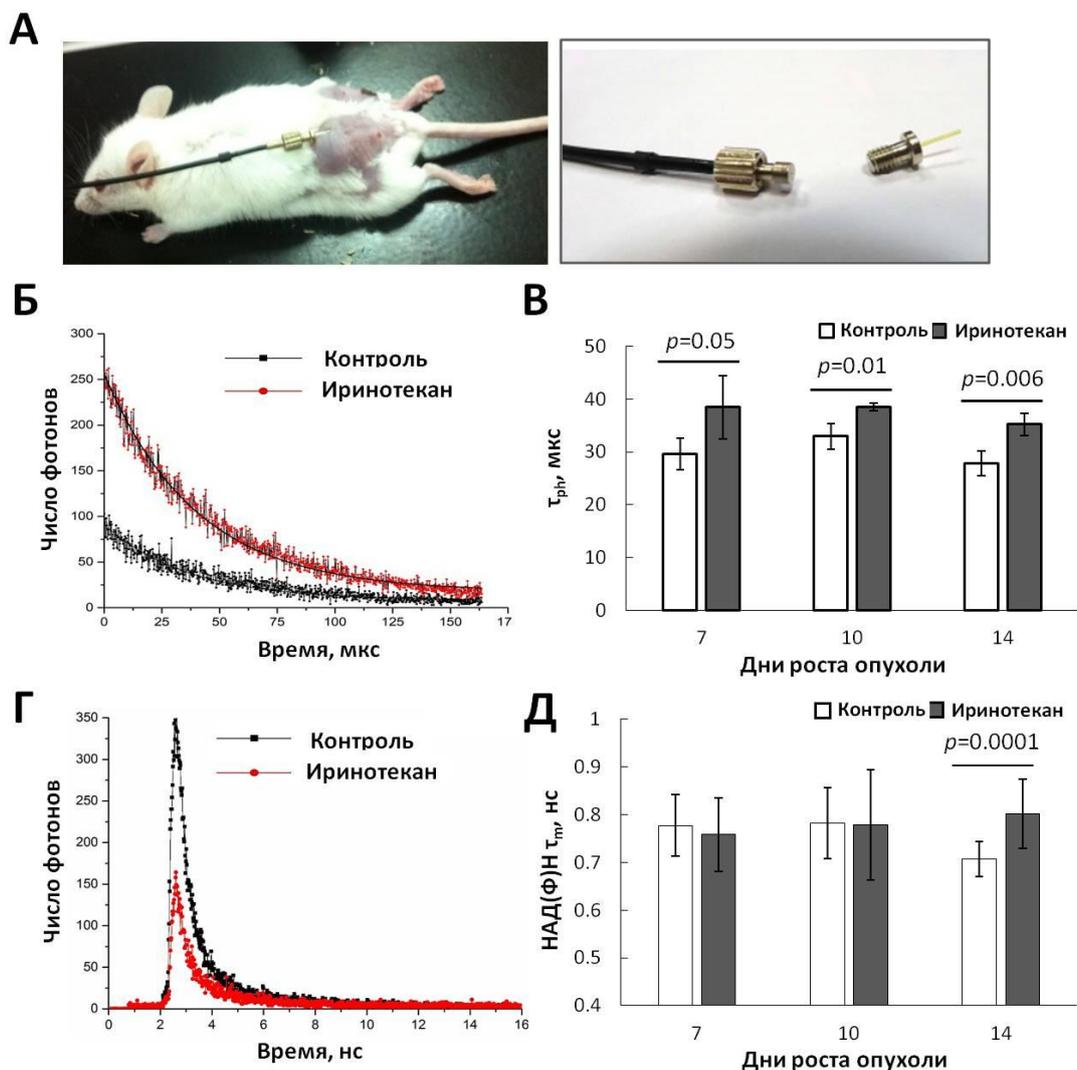


Рисунок 17. Одновременная оценка флуоресценции кислородного сенсора NanO2 и флуоресценции НАД(Ф)Н в опухолях мышей СТ26 *in vivo* при химиотерапии иринотеканом с помощью PLIM/FLIM спектроскопии. А – Фотография мыши с подкожной опухолью СТ26 с введенным в опухоль волоконным зондом (слева). Фотография торцевого конца волокна и игольчатого зонда (справа). Б – Кривые затухания флуоресценции кислородного сенсора NanO2 в контрольной и леченой иринотеканом опухолях на 10-й день роста. В – Результаты измерения времени жизни флуоресценции τ_{ph} в динамике в группах контроля и лечения. Среднее \pm SD. Г - Кривые затухания флуоресценции НАД(Ф)Н в контрольной и леченой опухолях на 14-й день роста. Д – Значения среднего времени жизни флуоресценции τ_m НАД(Ф)Н в динамике в группах контроля и лечения. Среднее \pm SD.

Установлено, что значение времени жизни флуоресценции сенсора BPTDM1 в контрольных нелеченых опухолях СТ26, экспрессирующих KillerRed, не изменялось в течение 5 дней наблюдения (с 15 по 19-й дни роста) и держалось на уровне ~ 3.9 мкс. В опухолях после облучения время жизни флуоресценции было повышено, начиная с 3 ч (4.46 ± 0.02 мкс, $p = 0.001$), что свидетельствует о сниженном содержании кислорода (рис. 18). Поскольку использование в качестве фотосенсибилизатора генетически

кодируемого белка, экспрессируемого самими опухолевыми клетками, исключает вероятность фотодинамического повреждения опухолевых сосудов, можно предположить, что изменения в содержании кислорода в опухоли на ранних временных точках (3-6 ч) после ФДТ обусловлены расходом кислорода на фотодинамические реакции. Наибольшие отличия в кислородном статусе леченых и нелеченых опухолей зафиксированы через 48 ч после ФДТ (5.46 ± 0.07 мкс, $p=0.003$), что, вероятно, обусловлено повышенным потреблением кислорода опухолевыми клетками в связи с окислительным стрессом, вызванным повреждением ДНК. Через 5 дней после ФДТ значения времени жизни флуоресценции были ниже по сравнению с контрольными опухолями (3.77 ± 0.72 , $p=0.011$), что говорит о реоксигенации леченых опухолей.

В эксперименте по анализу кислородного статуса опухолей при ФДТ с фотодитазином было выявлено, что уже через 3 ч после облучения время жизни флуоресценции ВТРДМ1 в опухолях возрастает с 4.96 ± 0.35 мкс до 6.09 ± 0.21 мкс ($p=0.001$), что свидетельствует о резком снижении содержания кислорода в опухоли (рис. 18). Затем, через 24 ч и 48 ч после облучения зафиксировано значительное снижение времени жизни флуоресценции ВТРДМ1, что может быть связано с реоксигенацией опухолевой ткани. Однако через 5 дней после облучения время жизни флуоресценции по сравнению с контролем вновь увеличивалось. Таким образом, нами показано, что сосудистая ФДТ с фотодитазином вызывает эффекты немедленной (3-6 ч) и отсроченной (5 дней) гипоксии опухоли. Вероятно, немедленная гипоксия обусловлена прекращением поступления кислорода в ткань в связи с расходом его на фотодинамические реакции, а отсроченная – необратимыми нарушениями кровотока в результате ФДТ.

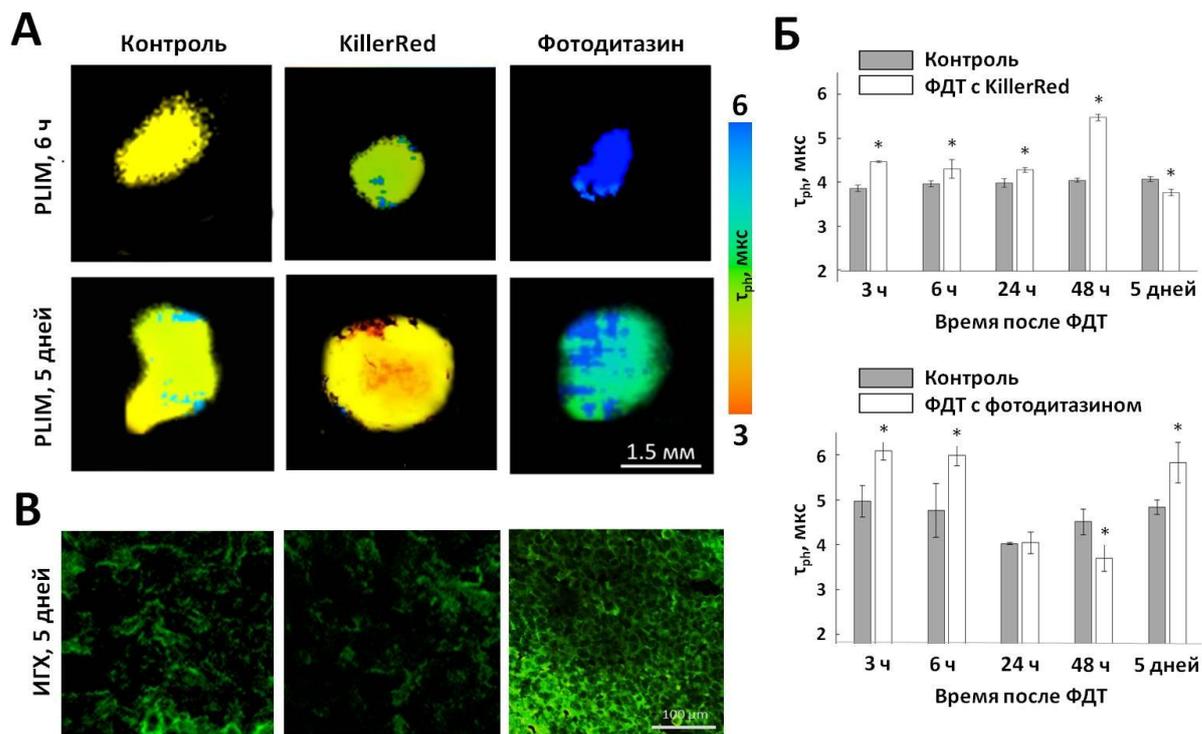


Рисунок 18. In vivo оценка кислородного статуса опухолей мышей СТ26 in vivo после ФДТ методом макро-PLIM. А – Репрезентативные PLIM-изображения опухолей в контроле, через 6 ч и 5 дней после ФДТ с фотосенсибилизаторами KillerRed или фотодитазин. Б – Анализ времени жизни флуоресценции τ_{ph} кислородного сенсора ВТРДМ1 в динамике в группах контроля и лечения. Среднее \pm SEM (n = 3-4 опухоли). * - $p \leq 0.05$ в сравнении с контролем в той же временной точке. В – Верификация гипоксии с помощью ИГХ с пимонидазолом (НурохурprobeTM-1 с флуоресцентной меткой FITC) на 5-й день после ФДТ.

В тех же опухолях был исследован метаболический ответ на ФДТ на клеточном уровне методом FLIM-микроскопии НАД(Ф)Н (см. раздел. 2.7). Сопоставление данных PLIM и FLIM позволило установить, что при снижении уровня кислорода в клетках в результате ФДТ метаболические реакции могут различаться. В случае клеточной ФДТ с KillerRed был зарегистрирован сдвиг на гликолиз (повышение вклада α_1 НАД(Ф)Н) на фоне снижения уровня кислорода на ранних этапах после воздействия. При ФДТ с фотодитазином было выявлено повышение вклада белок-связанной фракции α_2 НАД(Ф)Н, ассоциированной в первую очередь с митохондриальным дыханием. Причина разнонаправленных изменений в кинетике флуоресценции НАД(Ф)Н, индуцированных ФДТ, вероятно, кроется в различной степени гипоксии. В случае фотодитазина снижение содержания кислорода в опухолях было более выражено, что проявлялось в более высоких временах жизни флуоресценции сенсора и подтверждалось окраской с пимонидазолом. Известно, что слабая или острая гипоксия приводит к метаболической адаптации клеток в виде снижения их дыхательной активности и активации гликолиза, тогда как в условиях тяжелой гипоксии при очень низких значениях pO_2 или длительной гипоксии

имеет место подавление электрон-транспортной функции дыхательной цепи. При этом I комплекс претерпевает конформационные изменения, ведущие к его дезактивации, а степень восстановленности внутриклеточного НАДН увеличивается [101, 103, 104].

Впервые кислородный статус опухолей исследовался одновременно с энергетическим метаболизмом при ФДТ методами оптического биоимиджинга.

2.9 Связь энергетического метаболизма с физико-химическими показателями опухолевых клеток - рН и микровязкостью

Характерной чертой любой клетки является тесная взаимосвязь ее физико-химических свойств с биохимическими процессами и клеточными функциями. В числе основных физико-химических параметров клетки - рН и вязкость. И тот, и другой считаются показателями клеточного гомеостаза и жестко контролируются и регулируются клеткой.

Известно, что в опухолевых клетках и тканях значения рН и микровязкости отдельных клеточных структур отличаются от нормальных клеток, и это имеет большое значение для опухолевой прогрессии и развития резистентности к химиотерапии. В частности, характерной чертой опухолевых клеток является «обратный» градиент внутри- (pH_i) и внеклеточного рН (pH_e), где pH_e лежит в области с кислых значений, а pH_i - в слабощелочной [105]. Гликолитический метаболизм опухолевых клеток имеет непосредственное отношение к формированию и поддержанию градиента рН. Связи рН и метаболизма в опухолевых клетках опосредованы, прежде всего, закислением внеклеточной среды продуктами гликолиза (в основном, лактатом) и рН-зависимостью ключевых ферментов метаболических путей [106].

Плазматическая мембрана опухолевых клеток имеет более высокую микровязкость (пониженную текучесть) по сравнению с нормальными клетками, однако, вязкость снижается при опухолевой миграции и инвазии [107]. Неотъемлемыми функциями мембраны являются поддержание целостности клетки и обеспечение обмена и взаимодействия с окружающей средой. Через мембрану в клетку поступают питательные вещества и кислород и выводятся продукты обмена, а ее микровязкость напрямую влияет на конформацию, и следовательно, активность мембранных белков, в том числе переносчиков глюкозы и ионных транспортеров. Однако микровязкость мембраны в опухолевых клетках и ее роль в регуляции энергетического обмена изучена крайне слабо.

Между тем, комплексное исследование процессов клеточного дыхания, рН и вязкости представляет интерес, как для фундаментального понимания регуляторных механизмов клеточной биоэнергетики, так и для разработки новых подходов к идентификации химиорезистентных опухолевых клеток.

pHi цитозоля. В наших работах был исследован *pHi* цитозоля опухолевых клеток при действии метаболических ингибиторов и ряда химиопрепаратов и сопоставлен характер и динамика изменений *pHi* с метаболическим ответом клеток и опухолей *in vivo*. Для мониторинга *pHi* были использованы генетически кодируемые флуоресцентные белки-сенсоры SypHer2 [108] и SypHerRed [109], первый из которых работает по радиометрическому принципу, а второй - по измерению интенсивности и времени жизни флуоресценции. В работе [A38] впервые была установлена зависимость времени жизни флуоресценции SypHerRed от *pHi* и разработаны методики измерения абсолютных значений *pHi* в клеточной культуре и опухолях животных *in vivo* с помощью FLIM-микроскопии и макро-FLIM, соответственно (рис. 19). Отметим, что определение абсолютных значений *pHi* в тканях опухоли *in vivo* с помощью радиометрического *pHi*-сенсора было невозможно [A5, 110].

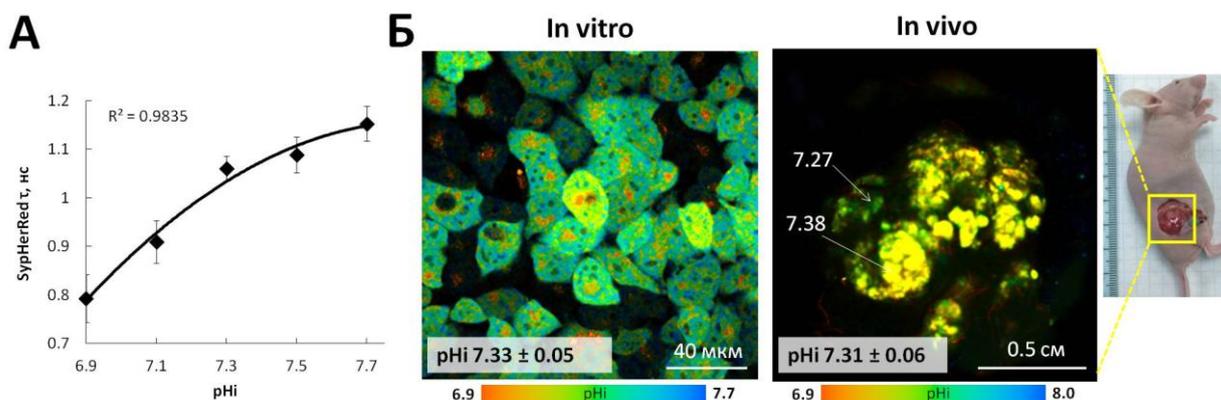


Рисунок 19. Оценка *pHi* в клетках рака шейки матки человека HeLa *in vitro* и ксенографте HeLa *in vivo* с помощью генетически-кодируемого сенсора SypHerRed. А – Калибровочная кривая для *pHi*-сенсора SypHerRed (зависимость времени жизни флуоресценции от *pHi*). Б – FLIM-микроскопия клеточной культуры HeLa, экспрессирующей SypHerRed и *in vivo* макро-FLIM опухоли HeLa, экспрессирующей SypHerRed. Область получения изображения выделена на фотографии мыши желтым квадратом. Средние значения *pHi* ±SD для клеток *in vitro* и опухолей *in vivo* приведены на изображениях. Стрелками показаны значения *pHi* в отдельных участках опухоли.

Одновременная визуализация *pHi* и НАД(Ф)Н показала согласованные изменения *pHi* и энергетического метаболизма при воздействии 3-бромпируватом (ингибитор гликолиза) и ротеноном (ингибитор митохондриального дыхания) в опухолевых клетках линии HeLa (рис. 20). В первом случае наблюдалось ингибирование гликолиза (повышение τ_m НАД(Ф)Н) и защелачивание цитозоля, во втором – активация гликолиза (понижение τ_m НАД(Ф)Н) и закисление внутриклеточной среды. Можно предположить, что закисление цитозоля является результатом накопления, а защелачивание, наоборот, снижением продукции кислых продуктов гликолиза (лактата).

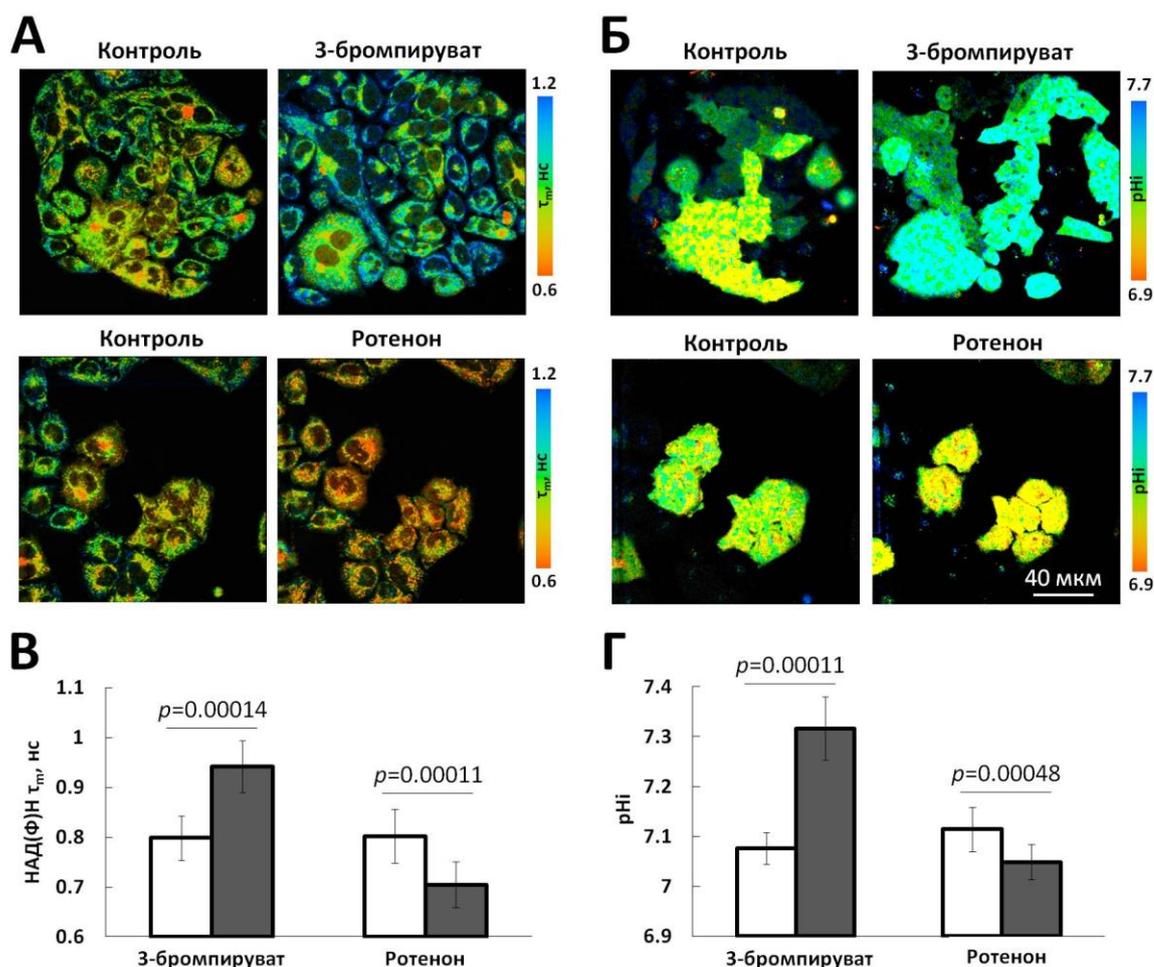


Рисунок 20. Одновременный имиджинг НАД(Ф)Н и рН_i в опухолевых клетках HeLa. А – FLIM-микроскопия НАД(Ф)Н в контроле и после воздействия 3-бромпируватом или ротеноном. Б - FLIM-микроскопия генетически кодируемого рН-сенсора SypHerRed в тех же клетках. В, Г – Изменения среднего времени жизни τ_m НАД(Ф)Н и рН_i при действии метаболических ингибиторов. Среднее \pm SD (n=25-35 клеток).

При кокультивировании опухолевых клеток и фибробластов параллельно с анализом энергетического метаболизма методом FLIM-микроскопии проводился анализ рН_i цитозоля с помощью сенсора SypHer2 [A6, A19]. Было показано, что в процессе взаимодействия опухолевых клеток и фибробластов рН_i в опухолевых клетках снижается. С учетом переключения этих клеток на гликолиз, изменения рН_i, вероятно, являются следствием высокой продукции лактата.

Взаимосвязь рН_i и энергетического метаболизма отмечалась при изучении гетерогенности опухолевых сфероидов. В зоне пролиферации в наружных слоях зрелого сфероида рН_i был более щелочной (~7.43), чем в зоне покоя (~7.23) [A5; 63]. В этой же зоне клетки демонстрировали более высокую интенсивность гликолиза (см. раздел 2.4.1). Данный результат хорошо соотносится с представлениями о том, что щелочной рН_i способствует активации аэробного гликолиза в опухолевых клетках [81].

Разобщенные изменения рН_i и энергетического метаболизма наблюдались при действии химиопрепаратов цисплатин и таксол. Ответ на цисплатин сопровождался закислением цитозоля в жизнеспособных клетках со сниженной пролиферацией в клеточной культуре и в опухолях животных *in vivo*. При этом данные FLIM НАД(Ф)Н свидетельствовали об активизация митохондриального дыхания [A12]. Схожая тенденция была отмечена и при воздействии таксолом на клетки *in vitro* и опухоли животных *in vivo* [A29]. Динамическое наблюдение за рН_i и кинетикой флуоресценции НАД(Ф)Н в опухолевых клетках *in vitro* позволило установить, что в обоих случаях флуктуации рН_i происходят рано – в период 1-6 часов инкубации с препаратом, в отличие от метаболических изменений, которые регистрируются не ранее 6 ч. Эти результаты указывают на то, что ранние нарушения рН_i при химиотерапевтическом воздействии не являются следствием перестройки биоэнергетических путей клетки, а вызваны, например, ингибированием рН-регуляторных систем клетки самими препаратами.

Таким образом, нам удалось показать, что рН_i и энергетический метаболизм взаимно детерминированы в условиях естественного роста. Изменение уровня гликолиза может вызывать изменения рН_i, но с другой стороны, рН_i способствует репрограммированию метаболизма опухолевых клеток. При химиотерапии, однако, эти связи разобщаются.

Микровязкость плазматической мембраны. Нами разработаны методики картирования микровязкости мембран опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* с помощью FLIM-микроскопии и вязкостного сенсора на основе BODIPY, представляющего собой флуоресцентный молекулярный ротор [111]. Впервые были получены значения микровязкости мембран клеток в составе опухолевых сфероидов и в опухолевой ткани животных *in vivo* [A10]. Установлено, что в живых опухолевых клетках в монослойной культуре и опухоли *in vivo* микровязкость мембран имеет схожие значения в диапазоне 340-490 сР, типичные для данного типа клеток [A10]. В случае сфероидов отдельный анализ микровязкости в наружных и внутренних слоях клеток, отличающихся по пролиферативной и метаболической активности, не выявил каких-либо отличий (рис. 21) [64]. Эти результаты позволяют рассматривать микровязкость как показатель клеточного гомеостаза.

Разработан протокол последовательного микроскопического исследования энергетического метаболизма с помощью FLIM НАД(Ф)Н и ФАД и микровязкости мембран в культивируемых клетках с помощью FLIM с сенсором BODIPY2 [A31]. Поскольку флуоресценция BODIPY2 спектрально перекрывается с НАД(Ф)Н и ФАД, а сам BODIPY2 очень быстро интернализуется клеткой, одновременный имиджинг микровязкости и кофакторов невозможен. При последовательном имиджинге сначала производится регистрация FLIM изображений кофакторов, затем клетки окрашиваются BODIPY2 и производится регистрация FLIM-изображений

VODIPY2 (рис. 21). Оценка микровязкости мембран и кинетики флуоресценции НАД(Ф)Н в одних и тех линиях опухолевых клеток не выявила связи между ними (как минимум, в условиях стандартного культивирования).

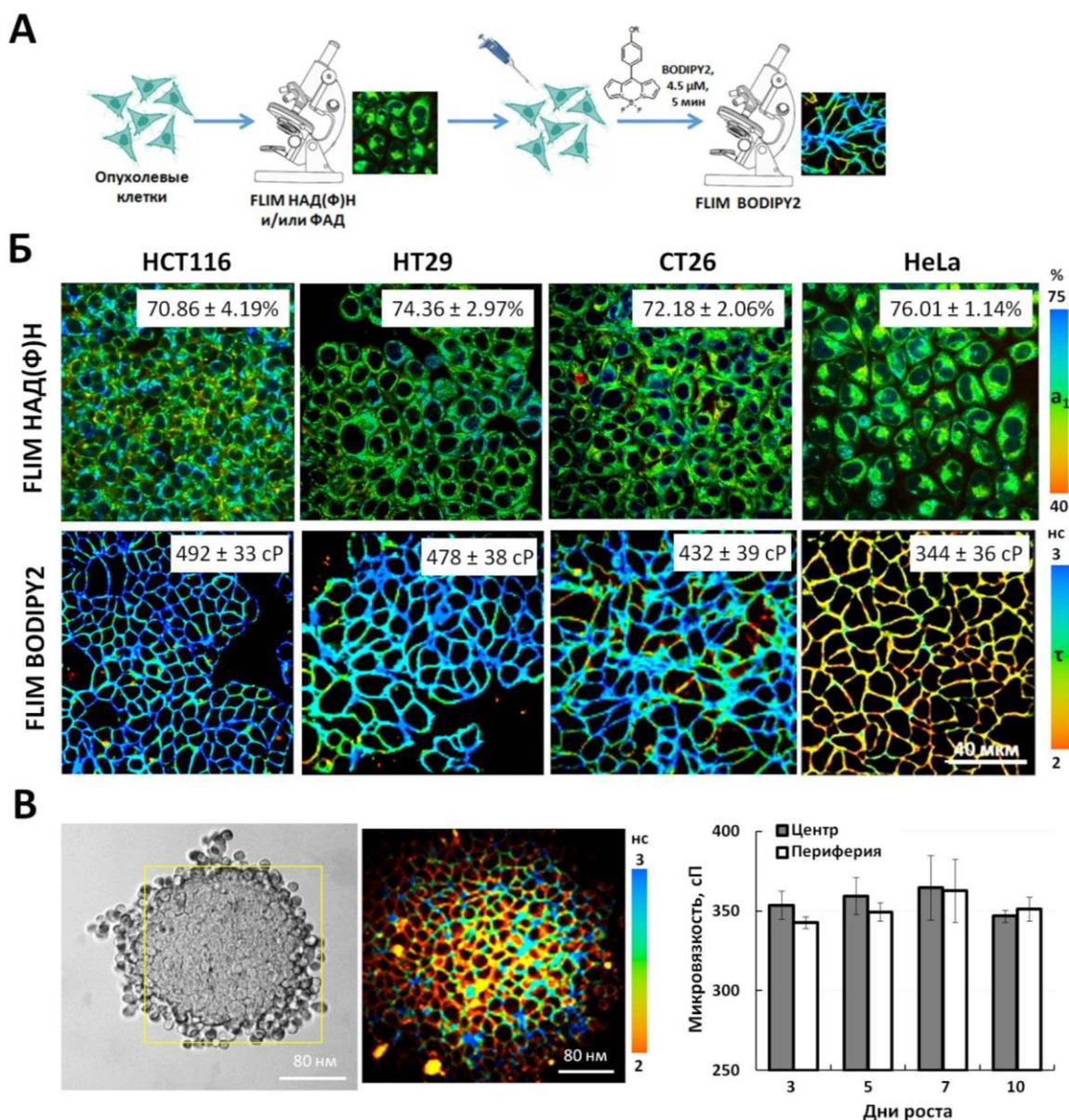


Рисунок 21. Анализ микровязкости цитоплазматической мембраны опухолевых клеток различных линий *in vitro* с помощью FLIM. А – Схема эксперимента по последовательному исследованию метаболизма и микровязкости в опухолевых клетках. Б – FLIM-изображения монослойных клеточных культур в канале НАД(Ф)Н и сенсора вязкости VODIPY2. Значения вкладов свободной формы НАД(Ф)Н a_1 и микровязкости для каждой линии клеток указаны на соответствующих изображениях. В – Оценка микровязкости в опухолевых сфероидах HeLa. Слева - изображение в проходящем свете (квадратом показана область, соответствующая FLIM-изображению) и FLIM-изображение сфероид на 5-й день роста. Справа - диаграмма значений микровязкости в центральной и периферической зонах сфероидов в процессе роста. Среднее \pm SD (n=4-5 сфероидов по 20-30 клеток в каждом).

В случае FLIM ФАД, обнаружена слабая положительная корреляция параметра затухания a_2 ФАД (вклад открытой конформации) с микровязкостью ($r = 0.436$). Предположительно, это обусловлено участием ФАД в липидном обмене – биосинтезе липидов и β -окислении жирных кислот и, как следствие, в поддержании липидного профиля мембраны. Качественный и количественный состав липидного бислоя является главным фактором, определяющим микровязкость мембраны. Уникальность липидного профиля мембраны в разных типах раковых клеток показана нами с помощью времяпролетной масс-спектрометрии ToF-SIMS [A58]. Однако интерпретация результатов FLIM ФАД требует осторожности, т.к. до сих пор нет понимания относительно вклада различных биохимических процессов, а также других флавинов (ФМН, рибофлавин) в его флуоресценцию.

Мониторинг микровязкости мембран при воздействии на опухолевые клетки *in vitro* препаратами платинового ряда, 5-фторурацилом, таксолом, показал, что разные препараты вызывают разные по динамике и выраженности изменения микровязкости [A24, A34, A41, A48]. При использовании цислатина/оксалиплатина и 5-фторурацила изменения микровязкости отмечались в ранний период воздействия (10 мин – 6 ч), в случае таксола – на более поздних временах инкубации (24-48 ч) (рис. 22). Во всех случаях изменения микровязкости были обусловлены, по крайней мере, частично, нарушениями липидного состава мембраны. Наши наблюдения за кинетикой флуоресценции НАД(Ф)Н в клетках при действии тех же препаратов и обнаружение одинакового характера изменений для разных препаратов, указывающих на отсроченное (6-24 ч) переключение на окислительное фосфорилирование, позволяют говорить об отсутствии явной связи между микровязкостью липидного бислоя мембраны и клеточной биоэнергетикой. Изменения микровязкости, как правило, предшествуют метаболическому ответу на химиотерапию и являются следствием изменений липидного состава мембраны.

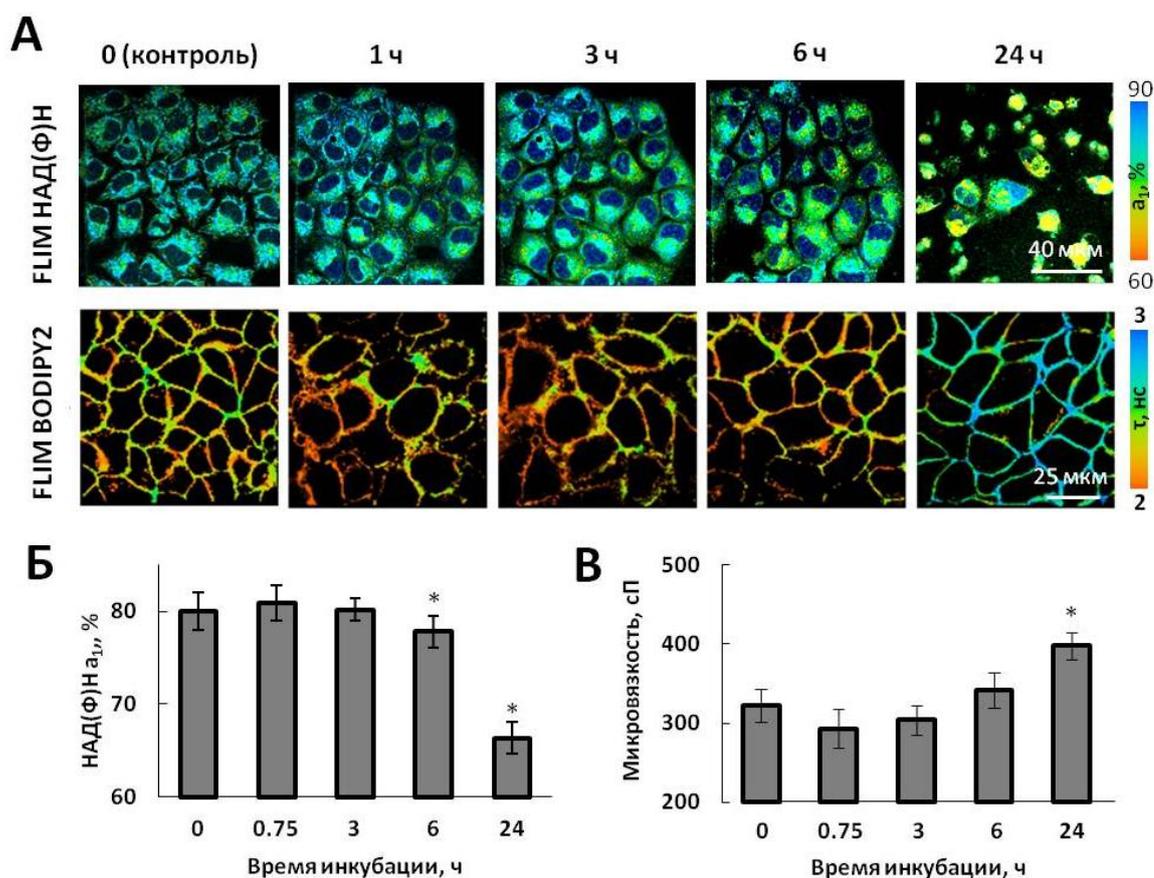


Рисунок 22. *In vitro* исследование энергетического метаболизма и микровязкости мембран клеток рака шейки матки человека HeLa с помощью FLIM-микроскопии при химиотерапии цисплатином. А – FLIM-изображения в канале НАД(Ф)Н (верхний ряд) и BODIPY2 (нижний ряд) до (контроль) и в процессе 24 ч инкубации с цисплатином (IC₅₀ 2.3 мкМ). FLIM-изображения НАД(Ф)Н до 6 ч сняты с одного и того же поля зрения. FLIM BODIPY2 выполнен в параллельном эксперименте. Б – Оценка относительного вклада свободной формы a_1 НАД(Ф)Н. В – Оценка микровязкости мембран опухолевых клеток. Среднее \pm SD (n= 50-60 клеток). * - $p \leq 0.05$ в сравнении с контролем.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Методы флуоресцентного имиджинга с временным разрешением FLIM являются мощным инструментом для получения информации о молекулярном микроокружении флуорофора в условиях живой клетки и ткани. Благодаря развитию технической базы FLIM и созданию новых флуоресцентных сенсоров с временной чувствительностью, за последнее десятилетие интерес к методам FLIM значительно вырос в различных областях биологии и биомедицины. Одним из главных приложений FLIM является «метаболический» имиджинг на основе автофлуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД. Высокое пространственное разрешение и молекулярная специфичность, быстрота получения данных без применения экзогенных контрастных агентов делают этот метод уникальным для анализа процессов клеточного дыхания на новом уровне.

В энергетическом метаболизме злокачественных опухолей многие вопросы остаются нераскрытыми. Эти вопросы касаются, прежде всего, его гетерогенности на клеточном уровне, роли различных физиологических и физико-химических факторов в регуляции путей получения энергии, перестроек биоэнергетики при прогрессии опухоли и ответе на противоопухолевую терапию и др. Между тем, их понимание критично для разработки новых подходов к диагностике и индивидуализации терапии опухолей.

Предыдущие исследования групп Avraham Mayevsky (Бар-Иланский университет, Израиль) [112,113], Irene Georgakoudi (Университет Тафтса, США) [52, 114], Ahmed A. Heikal (Университет Миннесота Дулут, США) [115], Michael R. Duchen (Университетский Колледж Лондона, Великобритания) [56, 116], Melissa Skala (Висконсинский университет в Мадисоне, США) [28, 54, 62, 86], Angelika Rueck (Университет Ульма, Германия) [58, 84, 117] убедительно доказали применимость автофлуоресцентных измерений НАД(Ф)Н и ФАД, как в режиме интенсивности, так и времени жизни, для оценки энергетического метаболизма клеток *in vitro* и тканей *in vivo*, и заложили методологические основы оптического метаболического имиджинга. Тем не менее, большинство исследований с применением FLIM до сих пор проводятся на клеточных культурах. Нами разработаны подходы для применения двухфотонной FLIM-микроскопии на сложных опухолевых моделях – сфероидах и опухолях мышей *in vivo*, и образцах опухолей пациентов, а также показаны возможности новых модальностей FLIM – конфокального макроимиджинга и оптоволоконной спектроскопии для оценки кинетики флуоресценции НАД(Ф)Н в опухолях.

Разработаны методики мультипараметрического имиджинга путем комбинации FLIM НАД(Ф)Н с генетически кодируемыми флуоресцентными сенсорами и фосфоресцентными красителями. Одновременный имиджинг НАД(Ф)Н и кислорода в опухолевых клетках *in vitro* комбинацией

FLIM/PLIM впервые был проведен в работе Kalinina et al. в 2016 г. [117]. Авторы продемонстрировали согласованные изменения в энергетическом метаболизме и кислородном статусе при действии фармакологических ингибиторов метаболизма. Мы адаптировали предложенную ими методику под флуоресцентный сенсор Pfr3 и расширили эти исследования до измерений в опухолях *in vivo*. Мультипараметрических исследований путем одновременной визуализации НАД(Ф)Н и красных флуоресцентных белков-сенсоров ранее не проводилось. Связано это, в том числе, с отсутствием до недавнего времени белков-сенсоров, работающих в красной области спектра. Большой вклад в создание таких инструментов внесли российские лаборатории под руководством К.А. Лукьянова, В.В. Белоусова, А.П. Савицкого. Задачи по изучению нескольких параметров, имеющих отношение к клеточному дыханию, отчасти решаются путем применения зеленых сенсорных белков или химических сенсоров в параллельных с наблюдением НАД(Ф)Н и/или ФАД экспериментах [Аб]. Однако это исключает возможность мультипараметрического анализа в одних и тех же клетках, что в условиях высокой межклеточной гетерогенности представляется важным.

Результаты наших мультипараметрических исследований раскрывают участие различных факторов в формировании метаболического «портрета» опухоли. Показано, что энергетический метаболизм клетки подвержен модификациям в условиях различного содержания кислорода, уровня пролиферации клеток, присутствия фибробластов и коллагена в непосредственном окружении. В свою очередь, изменения в энергетическом метаболизме влекут за собой изменения цитоплазматического рН_i, что имеет самостоятельное значение для опухолевого роста. Эти исследования подкрепляют существующие представления о том, что биоэнергетика опухолевых клеток представляет собой сложную, динамичную и крайне пластичную систему [2-4, 6].

Гетерогенность энергетического метаболизма опухолей - широко признанный феномен. Работы в этой области направлены, в основном, на оценку прогностического значения внутриопухолевой гетерогенности или метаболических особенностей индивидуальных опухолей. Ряд работ демонстрирует связь внутриопухолевой гетерогенности метаболизма, визуализированной на «макро» уровне с помощью ПЭТ с ¹⁸F-фтордезоксиглюкозой, с неблагоприятным прогнозом онкозаболеваний у пациентов [118-121]. Технологии секвенирования одиночных клеток (single-cell sequencing) позволяют проводить исследования метаболической гетерогенности на геномном, транскриптомном и метаболомном уровнях [122]. Среди них, мощнейшим инструментом в изучении внутриопухолевой гетерогенности метаболизма являются методы пространственной транскриптомики (например, Visium ST, Stereo-seq, Slide-seq), которые способны визуализировать отдельные кластеры клеток в опухоли, исходя из профилей пространственной экспрессии генов [123, 124]. В то же время,

сложность, трудоемкость и высокая стоимость данных методов ограничивают их широкое применение. Недоступные ранее наблюдения метаболической гетерогенности на клеточном уровне в живых клетках и тканях стали доступны благодаря FLIM-микроскопии на основе автофлуоресценции кофакторов дегидрогеназ. Пионером в этих исследованиях является группа Melissa Skala. С помощью FLIM авторы наблюдали и количественно оценили гетерогенность в опухолевых органоидах, полученных из операционного материала пациентов [125, 126]. Применение метода FLIM-микроскопии позволило нам впервые визуализировать межклеточную гетерогенность энергетического метаболизма в различных объектах: монослойных клеточных культурах, выделенных из опухолей пациентов, опухолевых сфероидах, модельных опухолях мышей и опухолях пациентов. Наши предварительные данные о связи высокой степени гетерогенности со злокачественным фенотипом опухоли и худшим ответом на химиотерапию согласуются с работами других авторов [118-121] и являются стимулом для продолжения исследований в этой области на расширенном клиническом материале. Мы уверены, что феномен внутриопухолевой метаболической гетерогенности заслуживает внимания и имеет большой потенциал в качестве прогностического критерия.

В диссертации показано, что перестройки в биоэнергетике опухолевых клеток сопровождают ответ на химиотерапию и ФДТ, а также наблюдаются при индукции апоптоза. Интересно, что разные по природе и механизму действия химиопрепараты вызывают схожие изменения в клеточном дыхании, ассоциированные с остановкой пролиферации. Характерно, что эти изменения предшествуют морфологическим клеточным нарушениям и торможению роста опухоли. В случае ФДТ, характер изменений энергетического метаболизма был разным в зависимости от степени снижения внутриклеточного уровня кислорода. Наши результаты о влиянии химиотерапии и ФДТ на энергетический метаболизм опухолевых клеток, полученные с помощью FLIM, согласуются с многочисленными работами других групп, полученными как методами биохимии, метаболомики и молекулярного анализа, так и с помощью оптического метаболического имиджинга [94, 125, 127].

Возможность ранней оценки терапевтического ответа с помощью FLIM открывает перспективу разработки нового подхода к индивидуализации лекарственной терапии путем анализа флуоресценции НАД(Ф)Н в клетках, выделенных из опухоли пациента. Индивидуальный подход к назначению таргетных и некоторых химиопрепаратов уже реализуется в клинике с помощью молекулярно-генетического анализа, который в случае таргетной терапии определяет наличие мишени для воздействия, а в случае химиотерапии – прогностические молекулярные маркеры [128, 129]. Но даже при использовании молекулярно-генетического анализа лечение бывает недостаточно эффективным. *In vitro* оценка лекарственной чувствительности опухолевых клеток путем прямого воздействия на них тестируемыми

препаратами признается перспективным подходом к решению задачи по индивидуализации противоопухолевой терапии, который может применяться как самостоятельно, так и в дополнение к молекулярно-генетическому анализу [A23, A53, 130, 131]. В отличие от традиционных клеточных тестов на выживаемость и тип гибели, FLIM-микроскопия требует меньшего объема материала, позволяет проводить измерения в динамике и дает уникальную информацию о вариациях энергетического обмена в клеточной популяции. Анализ ответа на терапию с помощью FLIM в клеточных моделях *in vitro* также представляет интерес для скрининга новых цитотоксичных соединений, прежде всего нацеленных на пути снабжения клеток энергией. Использование оптического метаболического имиджинга для прогнозирования эффективности химиотерапии и скрининга новых противоопухолевых препаратов показано в работах той же группы M. Skala на опухолевых органоидах различного гистогенеза [31, 125, 126], а также в недавней работе Morelli et al. на органоидах из глиальных опухолей [132]. Ключевое отличие предлагаемой нами методики от этих работ – использование монослойной первичной культуры опухолевых клеток, что позволяет более аккуратно оценивать флуоресценцию НАД(Ф)Н в цитоплазме отдельных клеток и получать воспроизводимые результаты.

Мы продемонстрировали, что энергетический метаболизм опухолей может быть оценен с помощью FLIM НАД(Ф)Н не только на микроскопическом, но и на макро-уровне. Новые технологии конфокального макро-FLIM и оптоволоконной время-разрешенной спектроскопии дают возможность экспресс-оценки метаболического состояния ткани с поверхности образца *ex vivo*, в случае макро-FLIM, или с глубины опухоли *in vivo*, в случае спектроскопии. Наши результаты показывают, что чувствительности этих систем достаточно для обнаружения различий между опухолевой и нормальной тканью, а также детектирования изменений под действием терапии. Подобные технологии на основе регистрации автофлуоресценции тканей представляют интерес для клинических приложений, например, для интраоперационного определения границ опухолей, оптической экспресс-биопсии. Попытки использовать отличия автофлуоресцентных свойств опухолей от нормальной ткани для клинической диагностики предпринимаются с момента появления в 1990-х гг первых волоконных систем, позволяющих регистрировать спектры эмиссии лазерно-индуцированной автофлуоресценции тканей [133-135]. Однако такие измерения в биотканях осложнены влиянием многих факторов на интенсивность сигнала (поглощение, рассеяние, мощность возбуждающего излучения и др.) и значительным перекрыванием спектров эндогенных флуорофоров. Дополнение этих методов временным разрешением существенно повысило их специфичность, поскольку время жизни флуоресценции индивидуально для каждого флуорофора. Обширные исследования с применением FLIM для диагностики опухолей выполнены группой Laura Marcus (Калифорнийский университет в Дэвисе, США) [69, 70].

Разработанные ею установки для оптоволоконной время-разрешенной спектроскопии по принципу временной селекции (time-gating) близки к внедрению в нейрохиргию для прижизненной интраоперационной оценки границ глиальных опухолей. Многофотонные томографы с опцией FLIM от компании JenLab (Германия) являются примером клинической реализации FLIM-микроскопии. С их использованием демонстрируются хорошие результаты в прижизненной дифференциальной диагностике меланом и рака кожи на основе регистрации эндогенной флуоресценции [136, 137]. Поскольку прижизненный доступ к опухолям большинства локализаций с помощью FLIM-микроскопии невозможен, многие исследования выполняются на свежих послеоперационных или биопсийных образцах или криосрезах тканей. Примеры таких работ включают оценку границ опухолей в случае рака мочевого пузыря [138, 139], рака легкого [140], глиом [141], метастазов рака поджелудочной железы [142] и др. Благодаря активной разработке эндоскопических FLIM-систем [143-145], велика вероятность прижизненного исследования широкого спектра онкозаболеваний уже в ближайшем будущем. В то же время малый размер поля зрения и отсутствие стандартизированных алгоритмов обработки микроскопических данных с автоматической сегментацией изображений ткани являются ограничениями FLIM-микроскопии. Большой интерес для клиники представляют системы для получения макро-изображений. В основном, подобные FLIM-системы основаны на широкопольном (wide-field) имиджинге с помощью камеры; они обеспечивают быстрое получение изображений, однако обладают меньшим пространственным и временным разрешением по сравнению с конфокальной системой, использованной в нашей работе. Хотя широкопольный FLIM НАД(Ф)Н был использован в нескольких клинических исследованиях на *ex vivo* образцах для дифференцирования опухолей от нормальных тканей [33, 146], его развитие в последние годы притормозилось. В целом, все эти клинические работы и результаты наших исследований указывают на то, что базовые отличия энергетического метаболизма и биохимического состава опухолей от нормальных тканей могут стать основой для новых методов диагностики на основе эндогенной флуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД. Помимо нашей текущей работы по направлению интраоперационной диагностики глиом, со стороны клиницистов уже обозначен интерес в апробации метода макро-FLIM для определения чистоты резекции меланом и немеланомного рака кожи, а также для обнаружения метастазов рака молочной железы в лимфоузлах.

Стоит отметить, что наши открытия побудили другие научные группы к разработкам в области FLIM. Так, например, группа Е.В. Ширшина (МГУ им. Ломоносова) разработала алгоритмы автоматической сегментации клеток на FLIM-изображениях на основе машинного обучения [A37], которые мы сейчас используем при обработке данных. Та же группа на основе наших данных о метаболической гетерогенности опухолевых клеток предложила новый количественный критерий ее оценки – индекс бимодальности. Наши

наработки в области оптоволоконной спектроскопии были взяты за основу для создания эндоскопической FLIM-системы группой под руководством Франческо Павоне (Европейская лаборатория нелинейной спектроскопии LENS, Италия) [147], а так же оптоволоконной системы для комбинированных измерений времен жизни флуоресценции и спектров диффузного рассеяния группой под руководством А.В. Дунаева (Орловский государственный университет) [148].

Мы уверены, что предложенные методики и полученные нами результаты об особенностях клеточного дыхания в опухолях станут базой для дальнейшего продвижения FLIM в клинику в качестве метода диагностики и прогнозирования эффективности противоопухолевой терапии.

По результатам диссертационного исследования можно сделать следующие **выводы**:

1. Разработаны методики исследования энергетического метаболизма опухолевых клеток в моделях опухолевых сфероидов и подкожных опухолей мышей *in vivo*, а также в операционных образцах опухолей пациентов *ex vivo* с помощью FLIM НАД(Ф)Н. Относительные вклады короткой a_1 и длинной a_2 компонент затухания флуоресценции НАД(Ф)Н в диапазоне 450-500 нм являются параметрами, отражающими изменения в балансе гликолиза и митохондриального дыхания. Разработаны подходы к мультипараметрическому имиджингу *in vitro* и *in vivo* путем визуализации автофлуоресценции НАД(Ф)Н и флуоресценции генетически кодируемых белков-сенсоров pH, апоптоза, фаз клеточного цикла с помощью FLIM или фосфоресценции кислородных сенсоров с помощью PLIM.

2. С помощью FLIM-микроскопии НАД(Ф)Н выявлена межклеточная метаболическая гетерогенность в опухолевых сфероидах, опухолях мышей *in vivo*, образцах колоректального рака пациентов *ex vivo* и выделенных из них клетках. Наиболее высокая дисперсия вклада свободной формы НАД(Ф)Н a_1 , ассоциированной с гликолизом, характерна для опухолей пациентов и, среди них, для опухолей высокой степени злокачественности. В экспериментах *in vitro* обнаружено, что активное деление клеток (S/G2/M фазы клеточного цикла), взаимодействие с фибробластами, наличие коллагена и гипоксия независимо друг от друга вызывают увеличение фракции свободного НАД(Ф)Н a_1 , а значит, могут обуславливать гетерогенность энергетического метаболизма в опухолях.

3. При колоректальном раке и глиомах пациентов методами FLIM НАД(Ф)Н показано, что кинетика флуоресценции кофактора в опухолях отличается от нормальных тканей. По данным FLIM-микроскопии колоректальный рак T3 стадии имеет более низкие значения вклада свободной формы НАД(Ф)Н a_1 по сравнению с нормальным эпителием кишечника, что указывает на более окислительный метаболизм опухоли. Показано, что макро-FLIM в спектральном канале НАД(Ф)Н позволяет

дифференцировать глиобластому от белого вещества мозга. Опухоль характеризуется более короткими значениями среднего времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н τ_m и более высоким вкладом свободной формы НАД(Ф)Н a_1 .

4. Установлено, что химиотерапия препаратами из различных классов вызывает увеличение среднего времени жизни флуоресценции τ_m за счет снижения вклада свободной формы a_1 НАД(Ф)Н в опухолевых клетках *in vitro* и *in vivo*, что указывает на активацию митохондриального дыхания и коррелирует со снижением пролиферации *in vitro* и торможением роста опухоли *in vivo*. ФДТ приводит к разнонаправленным изменениям метаболизма. На фоне выраженного снижения содержания кислорода, установленного по данным PLIM, в опухоли за счет сосудистых нарушений в случае ФДТ с фотодитазином наблюдается снижение вклада свободной формы a_1 НАД(Ф)Н, тогда как умеренное снижение содержания кислорода при использовании генетически кодируемого фотосенсибилизатора KillerRed приводит к увеличению a_1 НАД(Ф)Н.

5. Путем одновременной визуализации флуоресценции НАД(Ф)Н и генетически кодируемого FRET сенсора активности каспазы-3 на клеточном уровне показано увеличение фракции связанного с белком НАДН, ассоциированного с аэробным этапом энергетического обмена, при апоптозе, вызванном различными агентами. Установлена корреляция активности каспазы-3 и фракции связанной формы НАДН a_2 с уровнем АФК в клетках. Обнаружена фосфорилированная форма НАДН – НАДФН - в опухолевых клетках при апоптозе, индуцированном стауроспорином.

6. Одновременный мониторинг рН_i с помощью генетически кодируемых сенсоров из группы SynHer и автофлуоресценции НАД(Ф)Н показал, что переключение на гликолиз вызывает закисление цитозоля в опухолевых клетках. При воздействии химиопрепаратами эти связи разобщаются - флуктуации рН_i предшествуют изменениям в энергетическом метаболизме, а закисление цитозоля наблюдается на фоне окислительного метаболизма.

4. СПИСОК НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ЗА ПОСЛЕДНИЕ 10 ЛЕТ, В КОТОРЫХ ИЗЛОЖЕНЫ ОСНОВНЫЕ НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ:

A1. **M. Shirmanova**, D. Yuzhakova, L. Snopova, G. Perelman, E. Serebrovskaya, K. Lukyanov, I. Turchin, P. Subochev, S. Lukyanov, V. Kamensky, E. Zagaynova. Towards PDT with genetically encoded photosensitizer KillerRed: a comparison of continuous and pulsed laser regimens in an animal tumor model // *PloS one*. – 2015. – Т. 10. – №. 12. – С. e0144617. doi:10.1371/journal.pone.0144617 (IF 3.23, WoS, Scopus, **Q1**)

A2. D.S. Kuznetsova, **M.V. Shirmanova**, V.V. Dudenkova, P.V. Subochev, I.V. Turchin, E.V. Zagaynova, S.A. Lukyanov, and V.A. Kamensky. Photobleaching and phototoxicity of KillerRed in tumor spheroids induced by continuous wave and pulsed laser illumination // *Journal of biophotonics*. – 2015. – Т. 8. – №. 11-12. – С. 952-960. DOI 10.1002/jbio.201400130 (IF 3.099, WoS, Scopus, **Q1**)

A3. D.V. Yuzhakova, **M.V. Shirmanova**, E.O. Serebrovskaya, K.A. Lukyanov, I.N. Druzhkova, B.E. Shakhov, S.A. Lukyanov, E.V. Zagaynova. CT26 murine colon carcinoma expressing the red fluorescent protein KillerRed as a highly immunogenic tumor model // *Journal of Biomedical Optics*. – 2015. – Т. 20. – №. 8. – С. 088002. doi: 10.1117/1.JBO.20.8.088002 (IF 2.926, WoS, Scopus, **Q1**)

A4. T.F. Sergeeva, **M.V. Shirmanova**, E.V. Zagaynova, K.A. Lukyanov. Modern Research Techniques of Apoptotic Cell Death // *Современные технологии в медицине*. – 2015. – Т. 7. – №. 3 (eng). – С. 172-181. DOI: 10.17691/stm2015.7.3.21 (ИФ 0.169, WoS, Scopus, **RSCI**)

A5. **M.V. Shirmanova**, I.N. Druzhkova, M.M. Lukina, M.E. Matlashov, V.V. Belousov, L.B. Snopova, N.N. Prodanetz, V.V. Dudenkova, S.A. Lukyanov, E.V. Zagaynova. Intracellular pH imaging in cancer cells in vitro and tumors in vivo using the new genetically encoded sensor SypHer2 // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2015. – Т. 1850. – №. 9. – С. 1905-1911. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.05.001. (ИФ 3.829, WoS, Scopus, **Q1**)

A6. I.N. Druzhkova, **M.V. Shirmanova**, M.M. Lukina, V.V. Dudenkova, N.M. Mishina, E.V. Zagaynova. The metabolic interaction of cancer cells and fibroblasts—coupling between NAD(P)H and FAD, intracellular pH and hydrogen peroxide // *Cell cycle*. – 2016. – Т. 15. – №. 9. – С. 1257-1266. doi: 10.1080/15384101.2016.1160974. (ИФ 4.565, WoS, Scopus, **Q1**)

A7. O.A. Zlobovskaya, T.F. Sergeeva, **M.V. Shirmanova**, V.V. Dudenkova, G.V. Sharonov, E.V. Zagaynova, and K.A. Lukyanov. Genetically encoded far-red fluorescent sensors for caspase-3 activity // *BioTechniques*. – 2016. – Т. 60. – №. 2. – С. 62-68. doi 10.2144/000114377 (ИФ 2.298, WoS, Scopus, **Q2**)

A8. М.М. Лукина, **М.В. Ширманова**, Т.Ф. Сергеева, Е.В. Загайнова. Метаболический имиджинг в исследовании онкологических процессов

(обзор) // Современные технологии в медицине. – 2016. – Т. 8. – №. 4. – С. 113-128. DOI: 10.17691/stm2016.8.4.16 (ИФ 0.169, WoS, Scopus, **RSCI**)

A9. T.F. Sergeeva, **M.V. Shirmanova**, O.A. Zlobovskaya, A.I. Gavrina, V.V. Dudenkova, M.M. Lukina, K.A. Lukyanov, E.V. Zagaynova. Relationship between intracellular pH, metabolic co-factors and caspase-3 activation in cancer cells during apoptosis // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. – 2017. – Т. 1864. – №. 3. – С. 604-611. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.12.022> (ИФ 5.019, WoS, Scopus, **Q1**)

A10. L.E. Shimolina, M. Angeles Izquierdo, I. López-Duarte, J.A. Bull, **M.V. Shirmanova**, L.G. Klapshina, E.V. Zagaynova, M.K. Kuimova. Imaging tumor microscopic viscosity in vivo using molecular rotors // *Scientific reports*. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 41097. doi:10.1038/srep41097 (ИФ 5.525, WoS, Scopus, **Q1**)

A11. M. Lukina, A. Orlova, **M. Shirmanova**, D. Shirokov, A. Pavlikov, A. Neubauer, H. Studier, W. Becker, E. Zagaynova, T. Yoshihara, S. Tobita, and V. Shcheslavskiy. Interrogation of metabolic and oxygen states of tumors with fiber-based luminescence lifetime spectroscopy // *Optics Letters*. – 2017. – Т. 42. – №. 4. – С. 731-734. <https://doi.org/10.1364/OL.42.000731> (ИФ 3.040, WoS, Scopus, **Q1**)

A12. **M.V. Shirmanova**, I.N. Druzhkova, M.M. Lukina, V.V. Dudenkova, N.I. Ignatova, L.B. Snopova, V.I. Shcheslavskiy, V.V. Belousov, E.V. Zagaynova. Chemotherapy with cisplatin: insights into intracellular pH and metabolic landscape of cancer cells in vitro and in vivo // *Scientific reports*. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 8911. DOI:10.1038/s41598-017-09426-4 (ИФ 4.847, WoS, Scopus, **Q1**)

A13. M.M. Lukina, V.V. Dudenkova, N.I. Ignatova, I.N. Druzhkova, L.E. Shimolina, E.V. Zagaynova, and **M.V. Shirmanova**. Metabolic cofactors NAD (P) H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2018. – Т. 1862. – №. 8. – С. 1693-1700. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.021> (ИФ 5.08, WoS, Scopus, **Q1**)

A14. A. Gavrina, **M. Shirmanova**, N. Aksenova, D. Yuzhakova, L. Snopova, A. Solovieva, P. Timashev, V. Dudenkova, E. Zagaynova. Photodynamic therapy of mouse tumor model using chlorin e6-polyvinyl alcohol complex // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2018. – Т. 178. – С. 614-622. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.12.016> (ИФ 6.252, WoS, Scopus, **Q1**)

A15. V.I. Shcheslavskiy, **M.V. Shirmanova**, V.V. Dudenkova, K.A. Lukyanov, A.I. Gavrina, A.V. Shumilova, E. Zagaynova, W. Becker. Fluorescence time-resolved macroimaging // *Optics letters*. – 2018. – Т. 43. – №. 13. – С. 3152-3155. doi: 10.1364/OL.43.003152. (ИФ 3.589, WoS, Scopus, **Q1**)

A16. O.A. Zlobovskaya, **M.V. Shirmanova**, T.F. Kovaleva, K.S. Sarkisyan, E.V. Zagaynova, and K.A. Lukyanov. Sensors for Caspase Activities // *Russian*

Journal of Bioorganic Chemistry. – 2018. – Т. 44. – С. 645-652. DOI: 10.1134/S1068162018060109 (ИФ 0.9, WoS, Scopus, **RSCI**)

A17. М.М. Lukina, V.V. Dudenkova, L.E. Shimolina, L.B. Snopova, E.V. Zagaynova, **M.V. Shirmanova**. In vivo metabolic and SHG imaging for monitoring of tumor response to chemotherapy // Cytometry Part A. – 2019. – Т. 95. – №. 1. – С. 47-55. DOI: 10.1002/cyto.a.23607 (ИФ 4.714, WoS, Scopus, **Q1**)

A18. М. Lukina, L. Shimolina, N. Kiselev, V. Zagaynov, D. Komarov, E. Zagaynova, **M. Shirmanova**. Interrogation of tumor metabolism in tissue samples ex vivo using fluorescence lifetime imaging of NAD(P)H // Methods and Applications in Fluorescence. – 2019. – Т. 8. – №. 1. – С. 014002. doi: 10.1088/2050-6120/ab4ed8. (ИФ 2.940, WoS, Scopus, **Q1**)

A19. И.Н. Дружкова, М.М. Лукина, В.В. Дуденкова, **М.В. Ширманова**, Е.В. Загайнова. Метаболические изменения в фибробластах при взаимодействии с опухолевыми клетками: НАД(Ф)Н, ФАД, цитоплазматический рН и пероксид водорода // Патогенез. – 2019. – Т. 17. – №. 4. – С. 33-42. DOI: 10.25557/2310-0435.2019.04.33-42. (РИНЦ, Перечень ВАК, **K-2**)

A20. I. Druzhkova, N. Ignatova, N. Prodanets, N. Kiselev, I. Zhukov, **M. Shirmanova**, V. Zagaynov, E. Zagaynova. E-cadherin in colorectal cancer: relation to chemosensitivity // Clinical colorectal cancer. – 2019. – Т. 18. – №. 1. – С. e74-e86. doi: 10.1016/j.clcc.2018.10.003. (ИФ 3.861, WoS, Scopus, **Q1**)

A21. В.И. Щеславский, **М.В. Ширманова**, А. Ельцов, В. Беккер. Люминесцентная микроскопия на основе многопараметрического время-коррелированного счета фотонов // Успехи биологической химии. – 2019. – Т. 59. – С. 103-138. <https://www.fbras.ru/uspehi-biologicheskoy-himii-59-tom.html> (ИФ 2.8, WoS, Scopus, **RSCI**)

A22. I. Druzhkova, **M. Shirmanova**, N. Ignatova, V. Dudenkova, M. Lukina, E. Zagaynova, D. Safina, S. Kostrov, D. Didych, A. Kuzmich, G. Sharonov, O. Rakitina, I.V. Alekseenko, E. Sverdlov. Expression of EMT-related genes in hybrid E/M colorectal cancer cells determines fibroblast activation and collagen remodeling // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 21. – №. 21. – С. 8119. doi:10.3390/ijms21218119 (ИФ 4.556, WoS, Scopus, **Q1**)

A23. И.Н. Дружкова, **М.В. Ширманова**, Д.С. Кузнецова, М.М. Лукина, Е.В. Загайнова. Тестирование лекарственной чувствительности опухолей пациентов: современные подходы (обзор) // Современные технологии в медицине. – 2020. – Т. 12. – №. 4. – С. 91-105. DOI: 10.17691/stm2020.12.4.11 (ИФ 0.169, WoS, Scopus, **RSCI**)

A24. L.E. Shimolina, A.A. Gulin, M. Paez-Perez, I. López-Duarte, I.N. Druzhkova, М.М. Lukina, M.V. Gubina, N.J. Brooks, E.V. Zagaynova, M.K. Kuimova, **M.V. Shirmanova**. Mapping cisplatin-induced viscosity alterations in cancer cells using molecular rotor and fluorescence lifetime imaging microscopy // Journal of biomedical optics. – 2020. – Т. 25. – №. 12. – С. 126004-126004. doi: 10.1117/1.JBO.25.12.126004. (ИФ 2.785, WoS, Scopus, **Q1**)

A25. I. Kritchenkov, A. Elistratova, V. Sokolov, P. Chelushkin, **M. Shirmanova**, M. Lukina, V. Dudenkova, V. Shcheslavskiy, S. Kalinina, K. Reess, A. Rueck, S. Tunik. A biocompatible phosphorescent Ir (iii) oxygen sensor functionalized with oligo (ethylene glycol) groups: Synthesis, photophysics and application in PLIM experiments // *New Journal of Chemistry*. – 2020. – Т. 44. – №. 25. – С. 10459-10471. 10.1039/D0NJ01405B. (ИФ 3.925, WoS, Scopus, **Q2**)

A26. M.M. Lukina, M.A. Sirotkina, A.G. Orlova, V.V. Dudenkova, A.D. Komarova, A.A. Plekhanov, L.B. Snopova, E.V. Zagaynova, D.B. Papkovsky, V.I. Shcheslavskiy, and **M.V. Shirmanova**. Effects of irinotecan on tumor vasculature and oxygenation: an in vivo study on colorectal cancer model // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. – 2020. – Т. 27. – №. 4. – С. 1-8. DOI: 10.1109/JSTQE.2020.3047518 (ИФ 4.917, WoS, Scopus, **Q1**)

A27. **M.V. Shirmanova**, D.A. Gorbachev, K.S. Sarkisyan, A.P. Parnes, A.I. Gavrina, A.V. Polozova, T.F. Kovaleva, L.B. Snopova, V.V. Dudenkova, E.V. Zagaynova, K.A. Lukyanov. FUCCI-Red: a single-color cell cycle indicator for fluorescence lifetime imaging // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2021. – Т. 78. – С. 3467-3476. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03712-7> (ИФ 7.03, WoS, Scopus, **Q1**)

A28. M. Lukina, K. Yashin, E. Kiseleva, A. Alekseeva, V. Dudenkova, E.V. Zagaynova, E. Bederina, I. Medyanic, W. Becker, D. Mishra, M. Berezin, Shcheslavskiy V. I., **M. Shirmanova**. Label-Free Macroscopic Fluorescence Lifetime Imaging of Brain Tumors. // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – Т. 11. – С. 1781. DOI 10.3389/fonc.2021.666059 (ИФ 5.738, WoS, Scopus, **Q1**)

A29. I. Druzhkova, M. Lukina, V. Dudenkova, N. Ignatova, L. Snopova, A. Gavrina, L. Shimolina, E. Zagaynova, **M. Shirmanova**. Tracing of intracellular pH in cancer cells in response to Taxol treatment // *Cell Cycle*. – 2021. – Т. 20. – №. 16. – С. 1540-1551. DOI: 10.1080/15384101.2021.1949106 (ИФ 3.304, WoS, Scopus, **Q1**)

A30. D.V. Yuzhakova, **M.V. Shirmanova**, V.V. Klimenko, M.M. Lukina, A.I. Gavrina, A.D. Komarova, D.A. Gorbachev, N. Sapogova, K.A. Lukyanov and V. A. Kamensky. PDT with genetically encoded photosensitizer miniSOG on a tumor spheroid model: A comparative study of continuous-wave and pulsed irradiation // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2021. – Т. 1865. – №. 12. – С. 129978. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129978> (ИФ 3.67, WoS, Scopus, **Q1**)

A31. L. Shimolina, M. Lukina, V. Shcheslavskiy, V. Elagin, V. Dudenkova, N. Ignatova, M. K. Kuimova, **M. Shirmanova**. Probing metabolism and viscosity of cancer cells using fluorescence lifetime imaging microscopy // *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. – 2021. – №. 173. – С. e62708. DOI:10.3791/62708 (ИФ 1.4, WoS, Scopus, **Q2**)

A32. L.N. Bochkarev, Y.P. Parshina, Y.V. Gracheva, T.A. Kovylyna, S.A. Lermontova, L.G. Klapshina, A.N. Konev, M.A. Lopatin, M.M. Lukina, A.D. Komarova, V.I. Shcheslavskiy, **M.V. Shirmanova**. Red light-emitting water-soluble luminescent iridium-containing polynorbornenes: synthesis,

characterization and oxygen sensing properties in biological tissues in vivo //Molecules. – 2021. – T. 26. – №. 21. – C. 6349. <https://doi.org/10.3390/molecules26216349> (ИФ 3.267, WoS, Scopus, **Q1**)

A33. P. Morozov, M. Lukina, **M. Shirmanova**, A. Divochiy, V. Dudenkova, G. N. Gol'tsman, W. Becker, V. I. Shcheslavskiy. Singlet oxygen phosphorescence imaging by superconducting single-photon detector and time-correlated single-photon counting //Optics letters. – 2021. – T. 46. – №. 6. – C. 1217-1220. <https://doi.org/10.1364/OL.415229> (ИФ 3.040, WoS, Scopus, **Q1**)

A34. L. Shimolina, A. Gulin, N. Ignatova, I. Druzhkova, M. Gubina, M. Lukina, L. Snopova, E. Zagaynova, M. K. Kuimova and **M. Shirmanova**. The role of plasma membrane viscosity in the response and resistance of cancer cells to oxaliplatin // Cancers. – 2021. – T. 13. – №. 24. – C. 6165. <https://doi.org/10.3390/cancers13246165> (ИФ 6.639, WoS, Scopus, **Q1**)

A35. I.S. Kritchenkov, A.I. Solomatina, D.O. Kozina, V.V. Porsev, V.V. Sokolov, **M.V. Shirmanova**, M.M. Lukina, A.D. Komarova, V.I. Shcheslavskiy, T.N. Belyaeva, I.K. Litvinov, A.V. Salova, E.S. Kornilova, D.V. Kachkin, S.P. Tunik. Biocompatible Ir (III) complexes as oxygen sensors for phosphorescence lifetime imaging //Molecules. – 2021. – T. 26. – №. 10. – C. 2898. <https://doi.org/10.3390/molecules26102898> (ИФ 3.267, WoS, Scopus, **Q1**)

A36. **M.V. Shirmanova**, A.I. Gavrina, T.F. Kovaleva, V.V. Dudenkova, E.E. Zelenova, V.I. Shcheslavskiy, A.M. Mozherov, L.B. Snopova, K.A. Lukyanov & E.V. Zagaynova. Insight into redox regulation of apoptosis in cancer cells with multiparametric live-cell microscopy //Scientific reports. – 2022. – T. 12. – №. 1. – C. 4476. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08509-1> (ИФ 4.379, WoS, Scopus, **Q1**)

A37. E.A. Shirshin, **M.V. Shirmanova**, A.V. Gayer, M.M. Lukina, E.E. Nikonova, B.P. Yakimov, G.S. Budylin, V.V. Dudenkova, N.I. Ignatova, D.V. Komarov, V. Yakovlev, W. Becker, E.V. Zagaynova, V.I. Shcheslavskiy, and M.O. Scully. Label-free sensing of cells with fluorescence lifetime imaging: the quest for metabolic heterogeneity //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2022. – T. 119. – №. 9. – C. e2118241119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2118241119> (ИФ 12.291, WoS, Scopus, **Q1**)

A38. L. Shimolina, E. Potekhina, I. Druzhkova, M. Lukina, V. Dudenkova, V. Belousov, V. Shcheslavskiy, E. Zagaynova, **M. Shirmanova**. Fluorescence lifetime-based pH mapping of tumors in vivo using genetically encoded sensor SypHerRed //Biophysical Journal. – 2022. – T. 121. – №. 7. – C. 1156-1165. doi: 10.1016/j.bpj.2022.02.036. (ИФ 4.033, WoS, Scopus, **Q1**)

A39. D. Yuzhakova, E. Kiseleva, **M. Shirmanova**, V. Shcheslavskiy, D. Sachkova, L. Snopova, E. Bederina, M. Lukina, V. Dudenkova, G. Yusubalieva, T. Belovezhets, D. Matvienko, V. Baklaushev. Highly invasive fluorescent/bioluminescent patient-derived orthotopic model of glioblastoma in mice // Frontiers in Oncology. – 2022. – T. 12. – C. 897839. doi: 10.3389/fonc.2022.897839. (ИФ 5.738, WoS, Scopus, **Q1**)

A40. Y.P. Parshina, A.D. Komarova, L.N. Bochkarev, T.A. Kovylyina, A.A. Plekhanov, L.G. Klapshina, A.N. Konev, A.M. Mozherov, I.D. Shchechkin, M.A. Sirotkina, V.I. Shcheslavskiy, **M.V. Shirmanova**. Simultaneous probing of metabolism and oxygenation of tumors in vivo using FLIM of NAD (P) H and PLIM of a new polymeric Ir (III) oxygen sensor //International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – №. 18. – С. 10263. doi: 10.3390/ijms231810263. (ИФ 6.208, WoS, Scopus, **Q1**)

A41. L. Shimolina, A. Gulin, A. Khlynova, N. Ignatova, I. Druzhkova, M. Gubina, E. Zagaynova, M.K. Kuimova, **M. Shirmanova**. Development of resistance to 5-fluorouracil affects membrane viscosity and lipid composition of cancer cells //Methods and Applications in Fluorescence. – 2022. – Т. 10. – №. 4. – С. 044008. doi: 10.1088/2050-6120/ac89cd. (ИФ 3.21, WoS, Scopus, **Q1**)

A42. I. Druzhkova, E. Nikonova, N. Ignatova, I. Koryakina, M. Zyuzin, A. Mozherov, D. Kozlov, D. Krylov, D. Kuznetsova, U. Lisitsa, V. Shcheslavskiy, E.A. Shirshin, E. Zagaynova, **M. Shirmanova**. Effect of Collagen Matrix on Doxorubicin Distribution and Cancer Cells' Response to Treatment in 3D Tumor Model // Cancers. – 2022. – Т. 14. – №. 22. – С. 5487. doi: 10.3390/cancers14225487. (ИФ 6.639, WoS, Scopus, **Q1**)

A43. **М.В.Ширманова**, К.С. Яшин, А.Д. Комарова, Д.В. Южакова, Д.А. Сачкова, Е.Б. Киселева, М.М. Лукина, В.И. Щеславский, Е.В. Загайнова. Изучение возможностей флуоресцентного время-разрешенного макроимиджинга для интраоперационной диагностики глиом. // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68(S3). – С. 360-361. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2022-68-3%20Приложение> (Scopus, **RSCI**)

A44. И.Н. Дружкова, А.Д. Комарова, М.М. Лукина, А.М. Можеров, Н.И. Игнатова, Д.В. Комаров, Е.В. Загайнова, **М.В. Ширманова**. Разработка подхода к определению лекарственной чувствительности клеток колоректального рака с помощью флуоресцентной микроскопии с временным разрешением. // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68(S3). – С. 308-309. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2022-68-3%20Приложение> (Scopus, **RSCI**)

A45. Д.В. Южакова, Д.А.Сачкова, А.В. Изосимова, И.Н. Дружкова, Н.И. Игнатова, А.М. Можеров, Г.М. Юсубалиева, В.П. Баклаушев, А.А. Горчаков, К.С. Яшин, **М.В. Ширманова**. Создание пациент-специфических моделей глиобластомы для оценки раннего ответа на лечение методом флуоресцентной время-разрешенной микроскопии. // Вопросы онкологии. – Т. 68(S3). – 2022. – С. 362-363. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2022-68-3%20Приложение> (Scopus, **RSCI**)

A46. D.V. Yuzhakova, D.A. Sachkova, **M.V. Shirmanova**, A.M. Mozherov, A.V. Izosimova, A.S. Zolotova, K.S. Yashin. Measurement of Patient-Derived Glioblastoma Cell Response to Temozolomide Using Fluorescence Lifetime Imaging of NAD(P)H // Pharmaceuticals. – 2023. – Т. 16. – №. 6. – С. 796. <https://doi.org/10.3390/ph16060796> (ИФ 5.215, WoS, Scopus, **Q1**)

A47. D.V. Yuzhakova, M.M. Lukina, D.A. Sachkova, G.M. Yusubalieva, V.P. Baklaushev, A.M. Mozherov, V.V. Dudenkova, A.I. Gavrina, K.S. Yashin. **M.V. Shirmanova**. Development of a 3D Tumor Spheroid Model from the Patient's Glioblastoma Cells and Its Study by Metabolic Fluorescence Lifetime Imaging // *Современные технологии в медицине*. – 2023. – Т. 15. – №. 2 (eng). – С. 28-38. DOI: 10.17691/stm2023.15.2.03 (ИФ 0.169, WoS, Scopus, **RSCI**)

A48. L. Shimolina, A. Gulin, A. Khlynova, N. Ignatova, I. Druzhkova, M. Gubina, E. Zagaynova, M.K. Kuimova, **M. Shirmanova**. Effects of Paclitaxel on Plasma Membrane Microviscosity and Lipid Composition in Cancer Cells // *International journal of molecular sciences*. – 2023. – Т. 24. – №. 15. – С. 12186. <https://doi.org/10.3390/ijms241512186> (ИФ 4.556, WoS, Scopus, **Q1**)

A49. **М.В. Ширманова**, С.Д. Синюшкина, А.Д. Комарова. Метаболическая гетерогенность опухолей (обзор) // *Молекулярная биология*. – 2023. – Т. 57. – № 6. – С. 1130–1149. DOI: 10.31857/S0026898423060186 (ИФ 1.540, Scopus, **RSCI**).

A50. M. Samandarsangari, D.O. Kozina, V.V. Sokolov, A.D. Komarova, **M.V. Shirmanova**, I.S. Kritchenkov, S.P. Tunik. Biocompatible Phosphorescent O₂ Sensors Based on Ir (III) Complexes for In Vivo Hypoxia Imaging // *Biosensors*. – 2023. – Т. 13. – №. 7. – С. 680. <https://doi.org/10.3390/bios13070680> (ИФ 5.743, WoS, Scopus, **Q1**)

A51. Samandarsangari, M.; Kritchenkov, I.S.; Kozina, D.O.; Komarova, A.D.; **Shirmanova, M.V.**; Tunik, S.P. Phosphorescent O₂-Probes Based on Ir (III) Complexes for Bioimaging Applications // *Chemosensors*. – 2023. – Т. 11. – №. 5. – С. 263. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11050263> (ИФ 4.229, WoS, Scopus, **Q2**)

A52. I. Druzhkova, A. Komarova, E. Nikonova, V. Baigildin, A. Mozherov, Y. Shakirova, U. Lisitsa, V. Shcheslavskiy, N. Ignatova, E. Shirshin, **M. Shirmanova**, S. Tunik. Monitoring the Intracellular pH and Metabolic State of Cancer Cells in Response to Chemotherapy Using a Combination of Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Т. 25. – №. 1. – С. 49. doi: 10.3390/ijms25010049. (ИФ 5.6, WoS, Scopus, **Q1**)

A53. K.S. Yashin, D.V. Yuzhakova, D.A. Sachkova, L.S. Kukhnina, T.M. Kharitonova, A.S. Zolotova, I.A. Medyanik, **M.V. Shirmanova**. Personalized Medicine in Brain Gliomas: Targeted Therapy, Patient-Derived Tumor Models // *Современные технологии в медицине*. – 2023. – Т. 15. – №. 3 (eng). – С. 61-71. DOI: 10.17691/stm2023.15.3.07 (ИФ 0.169, WoS, Scopus, **RSCI**)

A54. И.Н. Дружкова, А.Д. Комарова, А.М. Можеров, М.М. Лукина, Н.И. Игнатова, В.М. Терехов, Е.В. Загайнова, **М.В. Ширманова**. Разработка подхода к определению лекарственной чувствительности клеток колоректального рака in vitro с использованием опухолевых слайсов. *Вопросы онкологии*. – 2023. – Т. 69(S3). – С. 311-312. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2023-69-3s1> (Scopus, **RSCI**)

A55. Д.А. Сачкова, **М.В. Ширманова**, Г.М. Юсубалиева, А.М. Можеров, А.В. Изосимова, В.П. Баклаушев, Д.В. Южакова. Выбор оптимальной модели глиом человека для оценки влияния гипоксии на метаболический статус *in vitro* с использованием флуоресцентного время-разрешенного имиджинга. Вопросы онкологии. – 2023. – Т. 69(S3). – С. 338-339. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2023-69-3s1> (Scopus, **RSCI**)

A56. Л.Е. Шимолина, А.Э. Хлынова, М.К. Куимова, А.М. Можеров, **М.В. Ширманова**. Визуализация и анализ изменений микровязкости мембран опухолевых клеток при фотодинамической терапии с фотодитазином. Вопросы онкологии. – 2023. – Т. 69(S3). – С. 347-348. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2023-69-3s1> (Scopus, **RSCI**)

A57. V. Shcheslavskiy, D.V. Yuzhakova, D. Sachkova, **M. Shirmanova**, and W. Becker. Macroscopic temporally and spectrally resolved fluorescence imaging enhanced by laser-wavelength multiplexing // Optics Letters. – 2023. – Т. 48. – №. 20. – С. 5309-5312. DOI: 10.1364/OL.501923 (ИФ 3.56, WoS, Scopus, **Q1**)

A58. Y.M. Efremov, L. Shimolina, A. Gulin, N. Ignatova, M. Gubina, М.К. Kuimova, P.S. Timashev, **M. Shirmanova**. Correlation of Plasma Membrane Microviscosity and Cell Stiffness Revealed via Fluorescence-Lifetime Imaging and Atomic Force Microscopy // Cells. – 2023. – Т. 12. – №. 21. – С. 2583. <https://doi.org/10.3390/cells12212583> (ИФ 7.666, WoS, Scopus, **Q1**)

A59. **M.V. Shirmanova**, M.M. Lukina, M.A. Sirotkina, L.E. Shimolina, V.V. Dudenkova, N.I. Ignatova, S. Tobita, V.I. Shcheslavskiy, E.V. Zagaynova. Effects of Photodynamic Therapy on Tumor Metabolism and Oxygenation Revealed by Fluorescence and Phosphorescence Lifetime Imaging //International journal of molecular sciences. – 2024. – Т. 25. – №. 3. – С. 1703. <https://doi.org/10.3390/ijms25031703> (ИФ 5.6, WoS, Scopus, **Q1**)

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. Hanahan; Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 2022; 12 (1): 31–46
2. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008 Jan;7(1):11-20.
3. Potter M, Newport E, Morten KJ. The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans.* 2016 Oct 15;44(5):1499-1505.
4. R. J. DeBerardinis, N. S. Chandel, Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* 2,e1600200 (2016).
5. Casey, J., Grinstein, S. avdeep& Orlowski, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 50–61 (2010).
6. Camille Lehuédé, Fanny Dupuy, Rebecca Rabinovitch, Russell G. Jones, Peter M. Siegel; Metabolic Plasticity as a Determinant of Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res* 15 September 2016; 76 (18): 5201–5208.
7. Gonçalves AC, Richiardone E, Jorge J, Polónia B, Xavier CPR, Salaroglio IC, Riganti C, Vasconcelos MH, Corbet C, Sarmento-Ribeiro AB. Impact of cancer metabolism on therapy resistance - Clinical implications. *Drug Resist Updat.* 2021 Dec;59:100797.
8. Zaal EA, Berkers CR. The Influence of Metabolism on Drug Response in Cancer. *Front Oncol.* 2018 Nov 2;8:500.
9. Chelakkot C, Chelakkot VS, Shin Y, Song K. Modulating Glycolysis to Improve Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 30;24(3):2606.
10. Zhao Z, Mei Y, Wang Z, He W. The Effect of Oxidative Phosphorylation on Cancer Drug Resistance. *Cancers (Basel).* 2022 Dec 22;15(1):62.
11. R. M. Mariaa, W. F. Alteib, H. S. Selistre-de-Araujo, Luiz A. Colnago, Impact of chemotherapy on metabolic reprogramming: Characterization of the metabolic profile of breast cancer MDA-MB-231 cells using 1H HR-MAS NMR spectroscopy / *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 146 (2017) 324–328
12. Turgeon MO, Perry NJS, Poulogiannis G. DNA Damage, Repair, and Cancer Metabolism. *Front Oncol.* 2018 Feb 5;8:15.
13. Missiroli S, Perrone M, Genovese I, Pinton P, Giorgi C. Cancer metabolism and mitochondria: Finding novel mechanisms to fight tumours. *EBioMedicine.* 2020 Sep;59:102943.
14. de Heer EC, Jalving M, Harris AL. HIFs, angiogenesis, and metabolism: elusive enemies in breast cancer. *J Clin Invest.* 2020 Oct 1;130(10):5074-5087.
15. Bhatnagar R, Dixit NM, Yang EH, Sallam T. Cancer therapy's impact on lipid metabolism: Mechanisms and future avenues. *Front Cardiovasc Med.* 2022 Aug 9;9:925816.
16. Becker, W. Fluorescence lifetime imaging – techniques and applications. *Journal of Microscopy,* (2012), 247: 119-136.
17. K., Karsten. Brief history of fluorescence lifetime imaging. *In Multiphoton Microscopy and Fluorescence Lifetime Imaging: Applications in Biology and Medicine,* edited by Karsten König, Berlin, Boston: De Gruyter, 2018, pp. 3-16.
18. X. F. Wang, A. Periasamy, B. Herman & D.M. Coleman (1992) Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM): Instrumentation and Applications, *Critical Reviews in Analytical Chemistry,* 23:5, 369-395
19. Berezin MY, Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem Rev.* 2010 May 12;110(5):2641-84.
20. K. Suhling, L. M. Hirvonen, J.A. Levitt, P.-H. Chung, C. Tregidgo, A. Le Marois, D. A. Rusakov, K. Zheng, S. Ameer-Beg, S. Poland, S. Coelho, R.Henderson, N. Krstajic, Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments, *Medical Photonics,* 27, 2015, Pages 3-40,
21. I. Georgakoudi and K.P. Quinn, Label-Free Optical Metabolic Imaging in Cells and Tissues, *Annu Rev Biomed Eng.* 2023 25:1, 413-443

22. Kolenc OI, Quinn KP. Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD(P)H and FAD. *Antioxid Redox Signal*. 2019 Feb 20;30(6):875-889.
23. Datta R, Gillette A, Stefely M, Skala MC. Recent innovations in fluorescence lifetime imaging microscopy for biology and medicine. *J Biomed Opt*. 2021 Jul;26(7):070603.
24. Schmidt DR, Patel R, Kirsch DG, Lewis CA, Vander Heiden MG, Locasale JW. Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. *CA Cancer J Clin*. 2021 Jul;71(4):333-358.
25. Kang, Y.P., Ward, N.P. & DeNicola, G.M. Recent advances in cancer metabolism: a technological perspective. *Exp Mol Med* 50, 1–16 (2018).
26. R. Shilpi, Z. Lingling, I. Xavier and B. Margarida, FLIM-FRET for Cancer Applications, *Current Molecular Imaging (Discontinued)* 2014; 3(2)
27. Periasamy, A., Mazumder, N., Sun, Y., Christopher, K.G., Day, R.N. (2015). FRET Microscopy: Basics, Issues and Advantages of FLIM-FRET Imaging. In: Becker, W. (eds) *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications*. Springer Series in Chemical Physics, vol 111. Springer, Cham.
28. Skala MC, Riching KM, Bird DK, Gendron-Fitzpatrick A, Eickhoff J, Eliceiri KW, Keely PJ, Ramanujam N. In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia. *J Biomed Opt*. 2007 Mar-Apr;12(2):024014.
29. Stringari, C., Abdeladim, L., Malkinson, G., Mahou, P., Solinas, X., Lamarre, I., Brizion, S., Galey, J., Supatto, W., Legouis, R., Pena, A., Beaurepaire, E. (2017). Multicolor two-photon imaging of endogenous fluorophores in living tissues by wavelength mixing. *Scientific Reports*. 7.
30. M. A. Yaseen, S. Sakadžić, W. Wu, W. Becker, K. A. Kasischke, and D.A. Boas, "In vivo imaging of cerebral energy metabolism with two-photon fluorescence lifetime microscopy of NADH," *Biomed. Opt. Express* 4, 307-321 (2013)
31. Skala MC, Deming DA, Kratz JD. Technologies to Assess Drug Response and Heterogeneity in Patient-Derived Cancer Organoids. *Annu Rev Biomed Eng*. 2022 Jun 6;24:157-177.
32. Suarez-Ibarrola R, Braun L, Pohlmann PF, Becker W, Bergmann A, Gratzke C, Miernik A, Wilhelm K. Metabolic Imaging of Urothelial Carcinoma by Simultaneous Autofluorescence Lifetime Imaging (FLIM) of NAD(P)H and FAD. *Clin Genitourin Cancer*. 2021 Feb;19(1):e31-e36.
33. Erkkilä MT, Reichert D, Gesperger J, Kiesel B, Roetzer T, Mercea PA, Drexler W, Unterhuber A, Leitgeb RA, Woehrer A, Rueck A, Andreana M, Widhalm G. Macroscopic fluorescence-lifetime imaging of NADH and protoporphyrin IX improves the detection and grading of 5-aminolevulinic acid-stained brain tumors. *Sci Rep*. 2020 Nov 24;10(1):20492.
34. Blacker TS, Sewell MDE, Szabadkai G, Duchen MR. Metabolic Profiling of Live Cancer Tissues Using NAD(P)H Fluorescence Lifetime Imaging. *Methods Mol Biol*. 2019;1928:365-387.
35. Sarder P, Maji D, Achilefu S. Molecular probes for fluorescence lifetime imaging. *Bioconjug Chem*. 2015 Jun 17;26(6):963-74.
36. Shi Y, Zhang W, Xue Y, Zhang J. Fluorescent Sensors for Detecting and Imaging Metal Ions in Biological Systems: Recent Advances and Future Perspectives. *Chemosensors*. 2023; 11(4):226.
37. Jena S, Parker LL. Fluorescence Lifetime Imaging Probes for Cell-Based Measurements of Enzyme Activity. *Methods Mol Biol*. 2022;2394:133-162.
38. Adair LD, New EJ. Molecular fluorescent sensors for in vivo imaging. *Curr Opin Biotechnol*. 2023 Oct;83:102973.
39. Berlin S, Carroll EC. Editorial: Next-Generation Genetically-Encoded Fluorescent Sensors. *Front Cell Neurosci*. 2020 Dec 3;14:627792.

40. Chelushkin, P. & Tunik, S. (2019). Phosphorescence Lifetime Imaging (PLIM): State of the Art and Perspectives: Recent Advances. In book: Progress in Photon Science (pp.109-128) Springer Series in Chemical Physss
41. Kalinina, S, Breymayer, J, Reeß, K, Lilge, L, Mandel, A, Rück, A. Correlation of intracellular oxygen and cell metabolism by simultaneous PLIM of phosphorescent TLD1433 and FLIM of NAD(P)H. *J. Biophotonics*. 2018; 11:e201800085.
42. Penjweini R, Roarke B, Alspaugh G, Gevorgyan A, Andreoni A, Pasut A, Sackett DL, Knutson JR. Single cell-based fluorescence lifetime imaging of intracellular oxygenation and metabolism. *Redox Biol*. 2020 Jul;34:101549.
43. Ghazi S, Bourgeois S, Gomariz A, Bugarski M, Haenni D, Martins JR, Nombela-Arrieta C, Unwin RJ, Wagner CA, Hall AM, Craigie E. Multiparametric imaging reveals that mitochondria-rich intercalated cells in the kidney collecting duct have a very high glycolytic capacity. *FASEB J*. 2020 Jun;34(6):8510-8525.
44. Okkelman IA, Neto N, Papkovsky DB, Monaghan MG, Dmitriev RI. A deeper understanding of intestinal organoid metabolism revealed by combining fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) and extracellular flux analyses. *Redox Biol*. 2020 Feb;30:101420.
45. Д. С. Билан, А. Г. Шохина, С. А. Лукьянов, В. В. Белоусов. Основные редокс-пары клетки. *Биоорганическая химия*. 2015, том 41, № 4, с. 385–402
46. Cannon TM, Lagarto JL, Dyer BT, Garcia E, Kelly DJ, Peters NS, Lyon AR, French PMW, Dunsby C. Characterization of NADH fluorescence properties under one-photon excitation with respect to temperature, pH, and binding to lactate dehydrogenase. *OSA Contin*. 2021 May 10;4(5):1610-1625.
47. van den Berg PA, Widengren J, Hink MA, Rigler R, Visser AJ. Fluorescence correlation spectroscopy of flavins and flavoenzymes: photochemical and photophysical aspects. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2001 Sep 14;57(11):2135-44.
48. Hühner J, Ingles-Prieto Á, Neusüß C, Lämmerhofer M, Janovjak H. Quantification of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in mammalian model cells by CE with LED-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*. 2015 Feb;36(4):518-25.
49. R.S. Rivlin, R. Hornibrook, M. Osnos. Effects of riboflavin deficiency upon concentrations of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in Novikoff hepatoma in rats. *Cancer Res*. 33(11), 3019-23 (1973).
50. Nsiah-Sefaa A, McKenzie M. Combined defects in oxidative phosphorylation and fatty acid β -oxidation in mitochondrial disease. *Bioscience Reports*. 2016 Feb;36(2):e00313.
51. Chance B, Schoener B, Oshino R, Itshak F, Nakase Y. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem*. 1979 Jun 10;254(11):4764-71.
52. Liu Z, Pouli D, Alonzo CA, Varone A, Karaliota S, Quinn KP, Münger K, Karalis KP, Georgakoudi I. Mapping metabolic changes by noninvasive, multiparametric, high-resolution imaging using endogenous contrast. *Sci Adv*. 2018 Mar 7;4(3):eaap9302.
53. J.R. Lakowicz, H. Szmajcinski, K. Nowaczyk, M.L. Johnson. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(4), 1271-5 (1992)
54. Sharick, J., Favreau, P., Gillette, A., Sdao, S., Merrins, M., Skala, M. Protein-bound NAD(P)H Lifetime is Sensitive to Multiple Fates of Glucose Carbon. *Scientific Reports*. 8. (2018).
55. Rooney, M., Neto, N., Monaghan, M. G., Hill, E., Porter, R. Conditionally immortalised equine skeletal muscle cell lines for in vitro analysis. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 33. 101391. (2023).
56. Blacker, T., Mann, Z. , Gale, J., Ziegler, M., Bain, A., Szabadkai, G., Duchon, M. Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM. *Nature communications*. 5. 3936. (2014).

57. Qian, T., Heaster, T., Houghtaling, A., Sun, K., Samimi, K., Skala, M. Label-free imaging for quality control of cardiomyocyte differentiation. *Nature Communications*. 12. (2021).
58. Kalinina S, Freymueller C, Naskar N, von Einem B, Reess K, Sroka R, Rueck A. Bioenergetic Alterations of Metabolic Redox Coenzymes as NADH, FAD and FMN by Means of Fluorescence Lifetime Imaging Techniques. *Int J Mol Sci*. 2021 May 31;22(11):5952.
59. Becker, W., Shcheslavskiy, V., Studier, H. (2015) TCSPC FLIM with different optical scanning techniques in *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications*, Springer, Switzerland, 65–117.
60. W. Becker, H. Stiel, E. Klose; Flexible instrument for time-correlated single-photon counting. *Rev. Sci. Instrum.* 1 December 1991; 62 (12): 2991–2996.
61. **Shirmanova, M.V.**, Shcheslavskiy, V.I., Lukina, M.M., Becker, W., Zagaynova, E.V. (2020). Exploring Tumor Metabolism with Time-Resolved Fluorescence Methods: from Single Cells to a Whole Tumor. In: Tuchin, V.V., Popp, J., Zakharov, V. (eds) *Multimodal Optical Diagnostics of Cancer*. Springer, Cham.
62. Skala MC, Riching KM, Gendron-Fitzpatrick A, Eickhoff J, Eliceiri KW, White JG, Ramanujam N. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 4;104(49):19494-9.
63. Zagaynova E.V., Druzhkova I.N., Mishina N.M., Ignatova N.I., Dudenkova V.V., **Shirmanova M.V.** Imaging of Intracellular pH in Tumor Spheroids Using Genetically Encoded Sensor SypHer2. In: Dmitriev R. (eds) *Multi-Parametric Live Cell Microscopy of 3D Tissue Models*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1035. Springer, Cham *Adv Exp Med Biol*. 2017;1035:105-119.
64. **Shirmanova M.V.**, Shimolina L.E., Lukina M.M., Zagaynova E.V., Kuimova M.K. Live Cell Imaging of Viscosity in 3D Tumour Cell Models. In: Dmitriev R. (eds) *Multi-Parametric Live Cell Microscopy of 3D Tissue Models*. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 1035:143-153.
65. A. D. Komarova, V. I. Shcheslavskiy, A. A. Plekhanov, M. A. Sirotkina, L. N. Bochkarev, **M. V. Shirmanova**, Oxygen assessment in tumors in vivo using phosphorescence lifetime imaging microscopy. In: Gilkes, D.M. (eds) *Hypoxia. Methods in Molecular Biology*, vol 2755. Humana, New York, NY. 2024, 2755:91-105. doi: 10.1007/978-1-0716-3633-6_6.
66. Ochoa M, Rudkouskaya A, Smith JT, Intes X, Barroso M. Macroscopic Fluorescence Lifetime Imaging for Monitoring of Drug-Target Engagement. *Methods Mol Biol*. 2022; 2394: 837-856.
67. Reichert D, Erkkilä MT, Holst G, Hecker-Denschlag N, Wilzbach M, Hauger C, Drexler W, Gesperger J, Kiesel B, Roetzer T, Unterhuber A, Widhalm G, Leitgeb RA, Andreana M. Towards real-time wide-field fluorescence lifetime imaging of 5-ALA labeled brain tumors with multi-tap CMOS cameras. *Biomed Opt Express*. 2020 Feb 26;11(3):1598-1616.
68. Rusanov AL, Ivashina TV, Vinokurov LM, Fiks II, Orlova AG, Turchin IV, Meerovich IG, Zherdeva VV, Savitsky AP. Lifetime imaging of FRET between red fluorescent proteins. *J Biophotonics*. 2010 Dec;3(12):774-83.
69. Weyers, B., Marsden, M., Sun, T., Bec, J., Bewley, A., Gandour-Edwards, R., Moore, M., Farwell, D., Marcu, L., Fluorescence Lifetime Imaging (FLIm) for Intraoperative Cancer Delineation in Transoral Robotic Surgery (TORS). *Translational Biophotonics*. 1. (2019).
70. Weyers BW, Birkeland AC, Marsden MA, Tam A, Bec J, Frusciantone RP, Gui D, Bewley AF, Abouyared M, Marcu L, Farwell DG. Intraoperative delineation of p16+ oropharyngeal carcinoma of unknown primary origin with fluorescence lifetime imaging: Preliminary report. *Head Neck*. 2022 Aug;44(8):1765-1776.
71. Ovechkina VS, Zakian SM, Medvedev SP, Valetdinova KR. Genetically Encoded Fluorescent Biosensors for Biomedical Applications. *Biomedicines*. 2021 Oct 24;9(11):1528
72. Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev*. 2010 Jul;90(3):1103-63.

73. Papkovsky DB, Dmitriev RI. Imaging of oxygen and hypoxia in cell and tissue samples. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Aug;75(16):2963-2980.
74. Wilson, D.F., Vinogradov, S., Lo, L.W., Huang, L. (1996). Oxygen Dependent Quenching of Phosphorescence. In: Ince, C., Kesecioglu, J., Telci, L., Akpir, K. (eds) *Oxygen Transport to Tissue XVII. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 388. Springer, Boston, MA.
75. Fercher A, Borisov SM, Zhdanov AV, Klimant I, Papkovsky DB. Intracellular O₂ sensing probe based on cell-penetrating phosphorescent nanoparticles. *ACS Nano.* 2011 Jul 26; 5(7):5499-508.
76. Yoshihara T, Hosaka M, Terata M, Ichikawa K, Murayama S, Tanaka A, Mori M, Itabashi H, Takeuchi T, Tobita S. Intracellular and in vivo oxygen sensing using phosphorescent Ir(III) complexes with a modified acetylacetonato ligand. *Anal Chem.* 2015 Mar 3;87(5):2710-7.
77. Nunes AS, Barros AS, Costa EC, Moreira AF, Correia IJ. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnol Bioeng.* 2019 Jan;116(1):206-226.
78. **M. Shirmanova**, T. Sergeeva, I. Druzhkova, A. Meleshina, M. Lukina, V. Dudenkova, V. Shcheslavskiy, W. Becker, V. Belousov, N. Mishina, and E. Zagaynova, Metabolic shifts and intracellular pH in cell proliferation and differentiation, Chapter 10 in *Multiphoton Microscopy and Fluorescence Lifetime Imaging. Applications in Biology and Medicine* Ed. by König, Karsten, De Gruyter, January 2018, ISBN 978-3-11-042998-5
79. Kopeina GS, Zhivotovsky B. Programmed cell death: Past, present and future. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022 Dec 10;633:55-58.
80. Bayir, H., Kagan, V.E. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis – there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care* 12, 206 (2008).
81. White KA, Grillo-Hill BK, Barber DL. Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance. *J Cell Sci.* 2017 Feb 15;130(4):663-669.
82. Meleshina AV, Dudenkova VV, Shirmanova MV, Shcheslavskiy VI, Becker W, Bystrova AS, Cherkasova EI, Zagaynova EV. Probing metabolic states of differentiating stem cells using two-photon FLIM. *Sci Rep.* 2016 Feb 25;6:21853.
83. Maldonado EB, Parsons S, Chen EY, Haslam A, Prasad V. Estimation of US patients with cancer who may respond to cytotoxic chemotherapy. *Future Sci OA.* 2020 May 25; 6(8): FSO600
84. Schaefer, Patrick & Hilpert, Diana & Niederschweiberer, Moritz & Neuhauser, Larissa & Kalinina, Sviatlana & Calzia, Enrico & Rueck, Angelika & Einem, Bjoern & von Arnim, Christine. Mitochondrial matrix pH as a decisive factor in neurometabolic imaging. *Neurophotonics.* 4. 1. (2017)
85. Damian K. Bird, Long Yan, Kristin M. Vrotsos, Kevin W. Eliceiri, Emily M. Vaughan, Patricia J. Keely, John G. White, Nirmala Ramanujam; Metabolic Mapping of MCF10A Human Breast Cells via Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging of the Coenzyme NADH. *Cancer Res* 2005; 65 (19): 8766–8773.
86. Shah AT, Demory Beckler M, Walsh AJ, Jones WP, Pohlmann PR, Skala MC. Optical metabolic imaging of treatment response in human head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2014 Mar 4;9(3):e90746.
87. Rück A, Hauser C, Mosch S, Kalinina S. Spectrally resolved fluorescence lifetime imaging to investigate cell metabolism in malignant and nonmalignant oral mucosa cells. *J Biomed Opt.* 2014 Sep;19(9):96005.
88. Correia JH, Rodrigues JA, Pimenta S, Dong T, Yang Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics.* 2021 Aug 25;13(9):1332.
89. Golding JP, Kemp-Symonds JG, Dobson JM. Glycolysis inhibition improves photodynamic therapy response rates for equine sarcoids. *Vet Comp Oncol.* 2017 Dec; 15(4): 1543-1552.

90. Chelakkot C, Chelakkot VS, Shin Y, Song K. Modulating Glycolysis to Improve Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(3):2606.
91. Mascaraque-Checa M, Gallego-Rentero M, Nicolás-Morala J, Portillo-Esnaola M, Cuezva JM, González S, Gilaberte Y, Juarranz Á. Metformin overcomes metabolic reprogramming-induced resistance of skin squamous cell carcinoma to photodynamic therapy. *Mol Metab*. 2022 Jun;60:101496.
92. Kessel D, Luo Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J Photochem Photobiol B*. 1998 Feb;42(2):89-95.
93. Hilf R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. *J Bioenerg Biomembr*. 2007 Feb;39(1):85-9.
94. Bérard V, Rousseau JA, Cadorette J, Hubert L, Bentourkia M, van Lier JE, Lecomte R. Dynamic imaging of transient metabolic processes by small-animal PET for the evaluation of photosensitizers in photodynamic therapy of cancer. *J Nucl Med*. 2006 Jul;47(7):1119-26.
95. Broekgaarden, M., Weijer, R., van Gulik, T.M. et al. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer Metastasis Rev* 34, 643–690 (2015).
96. Bulina ME, Chudakov DM, Britanova OV, Yanushevich YG, Staroverov DB, Chepurnykh TV, Merzlyak EM, Shkrob MA, Lukyanov S, Lukyanov KA. A genetically encoded photosensitizer. *Nat Biotechnol*. 2006 Jan;24(1):95-9.
97. **Shirmanova, M.V.**, Serebrovskaya, E.O., Lukyanov, K.A., Snopova, L.B., Sirotkina, M.A., Prodanetz, N.N., Bugrova, M.L., Zagaynova, E.V. Phototoxic effects of fluorescent protein KillerRed on tumor cells in mice. *Journal of Biophotonics*. 2013;6(3): 283 – 290
98. **М.В. Ширманова**, Л.Б. Снопина, Н.Н. Проданец, Е.О. Серебровская, Н.И. Евтеева, Е.А. Сергеева, В.А. Каменский, Н.В. Клементьева, К.А. Лукьянов, С.А. Лукьянов, Е.В. Загайнова Патоморфологическое исследование фототоксичности генетически кодируемого фотосенсибилизатора KillerRed на опухолях животных. *Современные технологии в медицине*, т 5. №1. 2013, 6-13
99. E.O. Serebrovskaya, A.P. Ryumina, M.E. Boulina, **M.V. Shirmanova**, E.V. Zagaynova, E.A. Bogdanova, S.A. Lukyanov, K.A. Lukyanov. Phototoxic effects of lysosome-associated genetically encoded photosensitizer Killer Red. *Journal of Biomedical Optics*. 2014; 19(7): 071403.
100. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)*. 2015 Dec 11; 3:83-92.
101. Eales, K., Hollinshead, K. & Tennant, D. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* 5, e190 (2016).
102. Bedi M, Ray M, Ghosh A. Active mitochondrial respiration in cancer: a target for the drug. *Mol Cell Biochem*. 2022 Feb;477(2):345-361.
103. Лукьянова Л.Д. Сигнальные механизмы гипоксии / Л.Д. Лукьянова, – М: РАН, 2019. – 215 с.
104. Gorenkova N, Robinson E, Grieve DJ, Galkin A. Conformational change of mitochondrial complex I increases ROS sensitivity during ischemia. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Nov 1;19(13):1459-68.
105. Damaghi, Mehdi & Wojtkowiak, Jonathan & Gillies, Robert. (2013). pH Sensing and Regulation in Cancer. *Frontiers in physiology*. 4. 370.
106. Swietach P. What is pH regulation, and why do cancer cells need it? *Cancer Metastasis Rev*. 2019 Jun;38(1-2):5-15.
107. Fei W, Yan J, Wu X, Yang S, Zhang X, Wang R, Chen Y, Xu J, Zheng C. Perturbing plasma membrane lipid: a new paradigm for tumor nanotherapeutics. *Theranostics*. 2023 Apr 23;13(8):2471-2491.
108. Matlashov ME, Bogdanova YA, Ermakova GV, Mishina NM, Ermakova YG, Nikitin ES, Balaban PM, Okabe S, Lukyanov S, Enikolopov G, Zaraisky AG, Belousov VV.

Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: Applications in neuroscience and regenerative biology. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Nov;1850(11):2318-28.

109. Ermakova, Y., Bilan, D., Matlashov, M. et al. Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Commun* 5, 5222 (2014).

110. **MV Shirmanova**, DV Yuzhakova, MM Lukina, AI Gavrina, AV Meleshina, IV Turchin, and EV Zagaynova. Whole-body fluorescence imaging in cancer research. In: Barroso, M. (Ed.) and Intes, X. (Ed.) *Imaging from Cells to Animals In Vivo*, Chapter 21. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2020. ISBN 9781138041097.

111. Paez-Perez, Miguel, Kuimova, Marina, Molecular rotors: Fluorescent Sensors for Microviscosity and Conformation of Biomolecules, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2023, e202311233.

112. Mayevsky A, Barbiro-Michaely E. Use of NADH fluorescence to determine mitochondrial function in vivo. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Oct;41(10):1977-88.

113. Avraham Mayevsky and Gennady G. Rogatsky. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2007 292:2, C615-C640

114. Georgakoudi I, Quinn KP. Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state. *Annu Rev Biomed Eng*. 2012;14:351-67.

115. Heikal AA. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark Med*. 2010 Apr;4(2):241-63.

116. Blacker TS, Duchen MR. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radic Biol Med*. 2016 Nov;100:53-65.

117. Kalinina S, Breymayer J, Schäfer P, Calzia E, Shcheslavskiy V, Becker W, Rück A. Correlative NAD(P)H-FLIM and oxygen sensing-PLIM for metabolic mapping. *J Biophotonics*. 2016 Aug;9(8):800-11.

118. Liu, X., Xiang, K., Geng, G. Y., Wang, S. C., Ni, M., Zhang, Y. F., Pan, H. F., & Lv, W. F. Prognostic Value of Intratumor Metabolic Heterogeneity Parameters on 18F-FDG PET/CT for Patients with Colorectal Cancer. *Contrast media & molecular imaging*, 2022, 2586245.

119. Xie Y, Liu C, Zhao Y, Gong C, Li Y, Hu S, Song S, Hu X, Yang Z, Wang B. Heterogeneity derived from 18 F-FDG PET/CT predicts immunotherapy outcome for metastatic triple-negative breast cancer patients. *Cancer Med*. 2022 May;11(9):1948-1955.

120. Liu, J., Si, Y., Zhou, Z. et al. The prognostic value of 18F-FDG PET/CT intratumoural metabolic heterogeneity in pretreatment neuroblastoma patients. *Cancer Imaging* 22, 32 (2022).

121. Senjo H, Hirata K, Izumiyama K, Minauchi K, Tsukamoto E, Itoh K, Kanaya M, Mori A, Ota S, Hashimoto D, Teshima T; North Japan Hematology Study Group. High metabolic heterogeneity on baseline 18FDG-PET/CT scan as a poor prognostic factor for newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv*. 2020 May 26;4(10):2286-2296.

122. Evers TMJ, Hochane M, Tans SJ, Heeren RMA, Semrau S, Nemes P, Mashaghi A. Deciphering Metabolic Heterogeneity by Single-Cell Analysis. *Anal Chem*. 2019 Nov 5;91(21):13314-13323.

123. Li Q, Zhang X, Ke R. Spatial Transcriptomics for Tumor Heterogeneity Analysis. *Front Genet*. 2022 Jul 5;13:906158.

124. Huang, D., Ma, N., Li, X. et al. Advances in single-cell RNA sequencing and its applications in cancer research. *J Hematol Oncol* 16, 98 (2023).

125. Walsh AJ, Cook RS, Sanders ME, Aurisicchio L, Ciliberto G, Arteaga CL, Skala MC. Quantitative optical imaging of primary tumor organoid metabolism predicts drug response in breast cancer. *Cancer Res*. 2014 Sep 15;74(18):5184-94.

126. Shah AT, Heaster TM, Skala MC. Metabolic Imaging of Head and Neck Cancer Organoids. *PLoS One*. 2017 Jan 18;12(1):e0170415.

127. Alam, S.R., Wallrabe, H., Svindrych, Z. et al. Investigation of Mitochondrial Metabolic Response to Doxorubicin in Prostate Cancer Cells: An NADH, FAD and Tryptophan FLIM Assay. *Sci Rep* 7, 10451 (2017).
128. Wang C, Zhang H, Liu Y, Wang Y, Hu H, Wang G. Molecular subtyping in colorectal cancer: A bridge to personalized therapy (Review). *Oncol Lett.* 2023 Apr 18;25(6):230.
129. Salgia R. Mutation testing for directing upfront targeted therapy and post-progression combination therapy strategies in lung adenocarcinoma. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016 Jul;16(7):737-49.
130. Имянитов Е.Н. Молекулярная диагностика в онкологии: новые тенденции, Том 19, № 4 (2019) 25-32
131. Klinghammer K, Walther W, Hoffmann J. Choosing wisely - Preclinical test models in the era of precision medicine. *Cancer Treat Rev.* 2017 Apr;55:36-45.
132. Morelli M, Lessi F, Barachini S, Liotti R, Montemurro N, Perrini P, Santonocito OS, Gambacciani C, Snuderl M, Pieri F, Aquila F, Farnesi A, Naccarato AG, Viacava P, Cardarelli F, Ferri G, Mulholland P, Ottaviani D, Paiar F, Liberti G, Pasqualetti F, Menicagli M, Aretini P, Signore G, Franceschi S, Mazzanti CM. Metabolic-imaging of human glioblastoma live tumors: A new precision-medicine approach to predict tumor treatment response early. *Front Oncol.* 2022 Sep 5;12:969812.
133. Y. Chung, J.A. Schwartz, C. Gardner, R.E. Sawaya, S.L. Jacques, Diagnostic potential of laser-induced autofluorescence emission in brain tissue, *Journal of Korean medical science* 12, 135-142 (1997)
134. Koenig F, McGovern FJ, Althausen AF, Deutsch TF, Schomacker KT. Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer. *J Urol.* 1996 Nov;156(5):1597-601.
135. Andersson-Engels, S., Johansson, J., Svanberg, K., & Svanberg, S. Laser-induced fluorescence in medical diagnostics. In T. J. Dougherty (Ed.), *Photodynamic Therapy: Mechanisms II* (Vol. 1203, pp. 76-96). (1990).
136. Lentsch G, Valdebran M, Saknite I, Smith J, Linden KG, König K, Barr RJ, Harris RM, Tromberg BJ, Ganesan AK, Zachary CB, Kelly KM, Balu M. Non-invasive optical biopsy by multiphoton microscopy identifies the live morphology of common melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2020 Nov;33(6):869-877.
137. Seidenari S, Arginelli F, Dunsby C, French PM, König K, Magnoni C, Talbot C, Ponti G. Multiphoton laser tomography and fluorescence lifetime imaging of melanoma: morphologic features and quantitative data for sensitive and specific non-invasive diagnostics. *PLoS One.* 2013 Jul 26;8(7):e70682.
138. Suarez-Ibarrola R, Braun L, Pohlmann PF, Becker W, Bergmann A, Gratzke C, Miernik A, Wilhelm K. Metabolic Imaging of Urothelial Carcinoma by Simultaneous Autofluorescence Lifetime Imaging (FLIM) of NAD(P)H and FAD. *Clin Genitourin Cancer.* 2021 Feb;19(1):e31-e36.
139. Wittenberg, T., Hackner, R., Bocklitz, T., Krafft, C., Becker, W., Braun, L., Pohlmann, P., Miernik, A., Suarez-Ibarrola, R. and Lemke, M. N.. "First results of computer-enhanced optical diagnosis of bladder cancer" *Current Directions in Biomedical Engineering*, vol. 6, no. 3, 2020, pp. 246-249.
140. Wang M, Tang F, Pan X, Yao L, Wang X, Jing Y, Ma J, Wang G, Mi L. Rapid diagnosis and intraoperative margin assessment of human lung cancer with fluorescence lifetime imaging microscopy. *BBA Clin.* 2017 Apr 27;8:7-13.
141. S.R. Kantelhardt, J. Leppert, J. Krajewski, N. Petkus, E. Reusche, V.M. Tronnier, G. Hüttmann, and A. Giese, Imaging of Brain and Brain Tumor Specimens by Time-Resolved Multiphoton Excitation Microscopy Ex Vivo, *Neuro Oncol.* 9, 103–112 (2007).
142. Shen B, Yan J, Wang S, Zhou F, Zhao Y, Hu R, Qu J, Liu L. Label-free whole-colony imaging and metabolic analysis of metastatic pancreatic cancer by an autoregulating flexible optical system. *Theranostics.* 2020 Jan 1;10(4):1849-1860.

143. Jo JA, Cheng S, Cuenca-Martinez R, Duran-Sierra E, Malik B, Ahmed B, Maitland K, Cheng YL, Wright J, Reese T. Endogenous Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) Endoscopy For Early Detection Of Oral Cancer And Dysplasia. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc.* 2018 Jul;2018:3009-3012.
144. Sun Y, Phipps JE, Meier J, Hatami N, Poirier B, Elson DS, Farwell DG, Marcu L. Endoscopic fluorescence lifetime imaging for in vivo intraoperative diagnosis of oral carcinoma. *Microsc Microanal.* 2013 Aug;19(4):791-8.
145. Kennedy, G.T., Coda, S., Thompson, A.J., Elson, D.S., Neil, M.A., Stamp, G., Thillainayagam, A.V., Viellerobe, B., Lacombe, F., Dunsby, C., & French, P.M. (2011). Fluorescence lifetime imaging endoscopy. *BiOS.*
146. N.P. Galletly, J. McGinty, C. Dunsby, F. Teixeira, J. Requejo-Isidro, I. Munro, D.S. Elson, M.A.A. Neil, A.C. Chu, P.M.W. French, G.W. Stamp, Fluorescence lifetime imaging distinguishes basal cell carcinoma from surrounding uninvolved skin, *British Journal of Dermatology*, 159, 1, 2008, 152–161
147. Lagarto JL, Shcheslavskiy V, Pavone FS, Cicchi R. Real-time fiber-based fluorescence lifetime imaging with synchronous external illumination: A new path for clinical translation. *J Biophotonics.* 2020 Mar;13(3):e201960119.
148. Zherebtsov EA, Potapova EV, Mamoshin AV, Shupletsov VV, Kandurova KY, Dremine VV, Abramov AY, Dunaev AV. Fluorescence lifetime needle optical biopsy discriminates hepatocellular carcinoma. *Biomed Opt Express.* 2022;13(2):633-646.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю огромную и искреннюю признательность своему научному консультанту и учителю Елене Вадимовне Загайновой за чуткое руководство, бесценную поддержку, доверие мне и всестороннее участие в нашем общем деле. Особая роль в данной работе принадлежит Сергею Анатольевичу Лукьянову – «мегагрант» под его руководством стал импульсом для начала исследований и моего профессионального роста.

Я глубоко благодарю своих коллег и друзей – сотрудников НИИ ЭО и БМТ В.И. Щеславского, Л.Е. Шимолину, И.Н. Дружкову, А.Д. Комарову, Д.В. Южакову, Н.И. Игнатову, Е.Б. Киселеву, Д.С. Кузнецову, М.М. Карabut, В.В. Елагина, В.В. Дуденкову, А.М. Можерова, А.А. Плеханова, А.И. Гаврину, А.В. Полозову и др., а также директора М.А. Сироткину за многолетнюю совместную работу и помощь в выполнении исследований. Слова сердечной благодарности адресую М.М. Лукиной, которая работала в нашем коллективе ранее и вместе со мной осваивала новое научное направление.

Эта работа не могла состояться без тесной коллаборации со многими талантливыми учеными из других организаций – К.А. Лукьяновым (ИБХ РАН), В.В. Белоусовым (ФЦМН ФМБА), В.П. Баклаушевым (ФНКЦ ФМБА), Е.А. Ширшиным (МГУ), А.А. Гулиным (ИХФ РАН), С.П. Туником (СПбГУ), Л.Н. Бочкаревым (ИМХ РАН), В.А. Каменским, И.В. Турчиным, А.Г. Орловой (ИПФ РАН), М.К. Kuimova (Imperial College London), W. Becker (Becker&Nickl) и их коллегами. Безмерно благодарю каждого из них.

Отдельное спасибо клиницистам В.Е. Загайнову (ПИМУ, НОКОД), К.С. Яшину (ПИМУ), С.В. Гамаюнову (НОКОД) и их коллегам за проявленный интерес к новому методу и сотрудничество.

Благодарю также всех тех, с кем довелось работать над проектами и публикациями, вошедшими в диссертацию, и кого не упомянула выше.