Joseph

Южакова Диана Владимировна

In vivo флуоресцентный имиджинг в исследовании новых препаратов для иммунои фотодинамической терапии опухолей

03.01.02 — биофизика

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

Научный руководитель:

Загайнова Елена Вадимовна, доктор медицинских наук, профессор РАН, директор НИИ Биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты: Мачнева Татьяна Вячеславовна, доктор медицинских наук, доцент кафедры медицинской биофизики, профессор кафедры физики и математики педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Генина Элина Алексеевна,** доктор физико-математических наук, доцент кафедры оптики и биофотоники ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского»

Ведущая организация:

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена — филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится 11 октября 2018 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.21 на базе ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, корп. 1

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» и на сайте: https://diss.unn.ru/files/2018/845/diss-Yuzhakova-845.pdf.

Автореферат разослан « » июля 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 212.166.21 кандидат биологических наук

**Мон** Соколова Е.А.

#### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

#### Актуальность проблемы

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности людей во всем мире. Чрезвычайно актуальной остаётся разработка новых препаратов для диагностики и терапии опухолей. Перспективным методом в области исследования новых vivo противоопухолевых препаратов in является флуоресцентный Бесспорными преимуществами данного метода являются возможность неинвазивного исследования, относительная простота и дешевизна использования в сочетании с чувствительностью достаточной И биологической безопасностью. Прижизненные исследования же на макроуровне дают уникальную возможность учитывать специфику взаимодействия опухоли и организма.

Флуоресцентный имиджинг на уровне целого организма позволяет проводить широкий спектр биомедицинских исследований, обладая рядом преимуществ перед другими методами. Данный подход позволяет изучить биораспределение новых флуоресцирующих агентов, оценить их накопление в опухоли и нормальных тканях организма в динамике и пути выведения из организма без умерщвления животных в ходе эксперимента, в отличие от традиционных методов, таких как химическая экстракция (Kaijzel et al, 2007; Ding et al, 2012).

Кроме того, актуальной задачей в разработке новых фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии (ФДТ) опухолей является отслеживание кинетики их флуоресценции и фотовыгорания в процессе облучения (Jarvi et al, 2012; Dysart et al, 2005). Известно, что флуоресцентный сигнал фотосенсибилизатора в опухоли снижается непосредственно после облучения, что свидетельствует о фотовыгорании флуорофора и, соответственно, о протекании реакции фотосенсибилизации. Дозиметрия на основе оценки фотовыгорания с помощью in vivo флуоресцентного имиджинга представляет собой чрезвычайно удобный, простой и недорогой способ анализа эффективности фотодинамической терапии (ФДТ) по сравнению с классической дозиметрией на основе оценки уровня синглетного кислорода.

Разработка новых способов иммунотерапии опухолей требует создания высокоиммуногенных опухолевых моделей. Особый интерес представляют модельные опухоли, меченные генетически-кодируемыми флуоресцентными белками. С одной стороны, флуоресцентные белки могут выступать в качестве дополнительных опухолевых антигенов, с другой стороны экспрессия флуоресцентных белков даёт возможность прижизненного мониторинга опухолевого роста и регрессии с помощью *in vivo* флуоресцентного имиджинга (*Stripecke et al, 1999; Castano et al, 2006*). Между тем, иммуногенные свойства красных флуоресцентных белков, спектры излучения которых попадают в «терапевтическое окно прозрачности» биологических тканей, на сегодня мало изучены.

В связи с этим, разработка новых фотосенсибилизаторов и иммунопрепаратов с использованием флуоресцентного имиджинга на уровне целого организма является актуальной задачей в области биомедицины.

#### Цели и задачи работы

Цель настоящей работы заключалась в in vivo исследовании методом флуоресцентного имиджинга на уровне целого организма новых иммунопрепаратов и фотосенсибилизаторов для  $\Phi$ ДТ.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Методом *in vivo* флуоресцентного имиджинга исследовать биораспределение двух новых флуоресцирующих металлорганических комплексов в опухоли и нормальных тканях и оценить эффективность ФДТ с использованием комплексов на основании данных об их фотовыгорании и торможении роста опухолей.

- 2. Оценить прижизненную экспрессию в опухоли и противоопухолевую активность нового иммуностимулирующего цитокина OX40Lexo путём визуализации зелёного флуоресцентного белка EGFP, коэкспрессирующегося с OX40Lexo.
- 3. С использованием *in vivo* флуоресцентного имиджинга исследовать иммуногенность красного флуоресцентного белка KillerRed в опухоли у мышей.
- 4. Изучить фототоксические свойства красного флуоресцентного белка KillerRed при воздействии непрерывного и импульсного лазерного излучения.

#### Научная новизна

- 1. Впервые методом *in vivo* флуоресцентного имиджинга получены данные о биораспределении, динамике циркуляции в организме и накоплении в опухоли двух новых флуоресцирующих металлоорганических комплексов порфиразиновых комплексов гадолиния путём оценки интенсивности сигнала флуоресценции комплексов в опухоли и нормальных тканях в динамике.
- 2. Впервые проведена оценка эффективности ФДТ с использованием двух новых порфиразиновых комплексов гадолиния на основании данных об их фотовыгорании и скорости роста опухолей после ФДТ. Установлено, что металлокомплекс, в периферийное обрамление порфиразинового макроцикла которого введены арильные фрагменты, обладает выраженными фототоксическими свойствами.
- 3. Впервые на флуоресцирующей опухолевой модели, коэкспрессирующей EGFP и новый иммуностимулирующий цитокин OX40Lexo, продемонстрированы противоопухолевые свойства OX40Lexo.
- 4. Впервые с использованием *in vivo* флуоресцентного имиджинга показана иммуногенность красного флуоресцентного белка KillerRed.
- 5. Впервые с помощью *in vivo* флуоресцентного имиджинга проведена сравнительная оценка фототоксических свойств красного флуоресцентного белка KillerRed в опухоли у мышей при воздействии непрерывного и импульсного лазерного излучения. Показано, что импульсный режим облучения опухолей способствует достижению максимума фотовыгорания KillerRed при меньшей световой дозе и отсутствии температурных эффектов по сравнению с непрерывным режимом. Подобран эффективный режим ФДТ с KillerRed опухолей у мышей с использованием импульсного лазерного излучения.

#### Научно-практическая значимость

В работе показана возможность выполнения широкого спектра неинвазивному исследованию инновационных противоопухолевых прижизненному организма препаратов уровне целого c помощью эпилюминисцентного флуоресцентного имиджинга. Разработаны универсальные методики по изучению биораспределения новых флуоресцирующих агентов, оценки фотовыгорания химически синтезируемых, так и генетически-кодируемых фотосенсибилизаторов. Разработана методика оценки эффективности иммунотерапии рака на опухолевой модели, меченной генетически-кодируемым флуоресцентным белком.

Результаты диссертационного исследования представляют практический интерес в области доклинических испытаний новых препаратов с флуоресцентными свойствами для диагностики и терапии опухолей с использованием относительно простого, быстрого и недорогого метода флуоресцентного имиджинга в сочетании с достаточной чувствительностью и биологической безопасностью. Основные результаты работы могут быть включены в соответствующие разделы спецкурсов и лекций общего курса по биофизике, биомедицине и физиологии человека и животных.

Научная новизна и практическая значимость исследования подтверждены патентом: Патент РФ № 2621710 от 26.08.2016 г. Порфиразин, порфиразиновый комплекс гадолиния и их применение. Клапшина Л.Г., Лермонтова С.А., Пескова Н.Н., Балалаева И.В., Шилягина Н.Ю., Ширманова М.В., Гаврина А.И., **Южакова Д.В**.

#### Основные положения, выносимые на защиту:

- 1. Два новых порфиразиновых комплекса гадолиния избирательно накапливаются в опухоли, что выражается в более высокой интенсивности сигнала флуоресценции комплекса в опухоли по сравнению с нормальными тканями.
- 2. Порфиразиновые комплексы гадолиния позволяют осуществлять оценку эффективности ФДТ на основании данных об их фотовыгорании в опухоли в ходе облучения и скорости роста опухолей после ФДТ. Порфиразиновый комплекс гадолиния, в периферийное обрамление макроцикла которого введены арильные фрагменты, обладает выраженными фототоксическими свойствами, отражающимися в снижении интенсивности флуоресценции комплекса в опухоли после облучения и торможении роста опухолей после ФДТ.
- 3. Флуоресцентный имиджинг позволяет прижизненно наблюдать экспрессию нового иммуностимулирующего цитокина ОХ40Lexo в опухоли путём зелёного флуоресцентного белка EGFP, коэкспрессирующегося с ОХ40Lexo. Экспрессия ОХ40Lexo приводит к регрессии опухолей и развитию иммунологической памяти.
- 4. Красный флуоресцентный белок KillerRed обладает иммуногенностью, выражающейся в снижении прививаемости и замедленном росте опухолей, экспрессирующих KillerRed по сравнению с немодифицированными опухолями, в устойчивости к формированию повторно привитых KillerRed-экспрессирующих опухолей и метастазов у мышей с ранее удалённой KillerRed-экспрессирующей опухолью, а также в снижении интенсивности флуоресценции повторно привитых опухолей.
- 5. Импульсный режим облучения KillerRed-экспрессирующих опухолей у мышей способствует достижению максимума фотовыгорания при меньшей световой дозе и отсутствии температурных эффектов, вызывает индукцию выраженных дистрофических изменений в опухолевых клетках и ингибирование роста опухолей после ФДТ.

#### Публикации

По теме диссертации опубликовано 24 работы, включая 6 статей, 1 патент и 17 тезисов конференций.

#### Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных в работе научных результатов подтверждается корректностью постановки *in vivo* и *ex vivo* экспериментов, широкой апробацией и надежностью использованных экспериментальных методов, соответствием экспериментальных данных, полученных разными методами, а также качественной и количественной согласованностью с результатами других исследований.

#### Апробация работы

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены научно-практической конференции Всероссийской c международным "Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике" (Москва, 2014 г.); Российско-Германском симпозиуме «Иммунология и рак» (Нижний Новгород, 2014 г.); VII Съезде Российского фотобиологического общества (пос. Шепси 2014 г.); II Всероссийской XIII Межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2015 г.); ХХ Нижегородской сессии молодых учёных (естественные, математические науки) (пансионат «Морозовский», 2015 г.); 7-ой Международной летней школе «Биофотоника'15» (Швеция, 2015 г.); V Международном симпозиуме «Актуальные проблемы биофотоники 2015» (Нижний Новгород – Елабуга – Нижний Новгород, 2015 г.); 4-й Фотобиологической школе Европейского Фотобиологического сообщества (Италия, 2016 г.); 3-й Зимней школе «Фотодинамическая терапия в онкодерматологии, дерматологии и косметологии» (Москва, 2017 г.); 70-я Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых учёных «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2017); IV Петербургском Международном Онкологическом Форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2017); VI Международном симпозиуме «Актуальные проблемы биофотоники 2017» (Санкт-Петербург — Нижний Новгород, 2017 г.); 17-м Конгрессе Европейского Фотобиологического сообщества (Италия, 2017 г); 71-ой Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», (Нижний Новгород, 17–20 апреля 2018 г).

#### Структура и объем диссертации.

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 104 страницах, содержит 33 рисунка и 6 таблиц. Список литературы содержит 163 источника.

#### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен обзор литературы, посвященный следующим основным темам: основам *in vivo* флуоресцентного имиджинга, преимуществам и областям применения данного метода в экспериментальной онкологии, роли *in vivo* флуоресцентного имиджинга в исследовании новых фотосенсибилизаторов для ФДТ, а также флуоресцентным белкам в качестве опухолевых антигенов.

В главе 2 перечислены использованные в работе реактивы и оборудование, приведены составы сред и растворов, описаны методики исследований.

Клеточные линии и опухолевые модели

Клеточные линии колоректального рака мышей СТ26, стабильно экспресссирующего KillerRed (CT26-KR), EGFP (CT26-EGFP) либо коэекспрессирующего EGFP и цитокин OX40Lexo (CT26-EGFP-OX40L) были созданы в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН) (Москва, Россия). Эксперименты проводились на мышах линии Balb/c весом 18-20 г. Для получения опухолевой модели мышам подкожно вводили опухолевые клетки в концентрации  $2x10^5$ ,  $5x10^5$  либо  $1x10^6$ клеток в 100 мкл фосфатно-соляного буфера (PBS). Замер опухолей проводили 3 раза в неделю штангенциркулем и рассчитывали объём по формуле V=a\*b\*1/2b, где a длина, а bдлина опухолевого узла. Коэффициент торможения роста опухолей на определённый день после терапии рассчитывали по формуле: TPO =  $(1 - ((V_T - V_{T0})/(V_K - V_{K0})/(V_K - V_{K0}))$  $(V_{K0}))$ \*100%, где  $(V_{T0})$  и  $(V_T)$  объём опухолей на первый день терапии и искомый день после терапии соответственно, а  $V_{K0}$  и  $V_K$  – объём опухолей в контрольной группе без лечения на те же сроки соответственно. Если коэффициент ТРО=0% – нет торможения роста 0-100% – опухоли растут медленнее, чем в контроле; >100% – опухоли опухолей: уменьшаются в размере. Все эксперименты, выполняемые на животных, проводились согласно протоколам работы Этического Комитета Приволжского исследовательского медицинского университета (Нижний Новгород, Россия).

In vivo флуоресцентный имиджинг

Флуоресцентный имиджинг животных с опухолью проводили с помощью установки для флуоресцентного имиджинга IVIS-Spectrum (Caliper Life Sciences, США) (режим регистрации эпилюминесценции). Флуоресценцию порфиразиновых комплексов гадолиния GdPz1 и GdPz2 возбуждали на длине волны 605/30 нм, регистрировали на 660/20 нм; KillerRed – соответственно на 570/30 нм и 620/20 нм; EGFP – соответственно на 465/30 нм и 520/20 нм. Также при оценке фотовыгорания KillerRed в опухоли получали *in vivo* флуоресцентные изображения с помощью установки для эпилюминесцентного имиджинга (ИПФ РАН, Россия) (возбуждение флуоресценции на 585 нм, приём на 685/80 нм). *In vivo* флуоресцентные изображения мышей с опухолью, экспрессирующей EGFP либо KillerRed, получали 2-3 раза в неделю. При количественном анализе в программе

LivingImage (Caliper Life Sciences, США) определяли усреднённую по интересующей области либо интегральную интенсивность флуоресценции (фотон/сек/см $^2$ /стерадиан)(мкмBт/см $^2$ ).

Исследование биораспределения новых порфиразиновых комплексов гадолиния

Два новых металлорганических комплекса на основе катиона гадолиния (III) в соединении c красными флуоресцентными тетрапиррольными макроциклами (порфиразинами) - GdPz1 (тетра-4-фтор-фенилтетрацианопорфиразиновый комплекс гадолиния) и GdPz2 (тетрафенилтетрацианопорфиразиновый комплекс гадолиния), - были синтезированы в Институте металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН. В GdPz1 в периферийное обрамление порфиразинового макроцикла введены парафторфенильные заместители, а в GdPz2 – арильные фрагменты. Для оценки накопления новых комплексов в опухоли и нормальных тканях мышам с опухолью СТ26 на 10-й день роста опухоли внутривенно в хвостовую вену вводили GdPz1 либо GdPz2 в дозе 12 мг/кг (0.01 ммоль/кг), растворённый в дистиллированной воде в концентрации 2.28 мг/мл, и получали *in vivo* флуоресцентные изображения животных спустя 15 мин, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч и 96 ч после введения препарата. Определяли усредненную интенсивность флуоресценции по площади опухоли и зоне нормальных тканей на противоположном бедре, при этом из значений вычитали соответствующие базовые значения автофлуоресценции тканей в искомых зонах до введения препарата. Для каждой временной точки рассчитывалось значение контраста накопления препарата в опухоли по сравнению с нормальными тканями по формуле: ( $U\Phi_{onvxoлb} - U\Phi_{Hopma}$ )/ ( $U\Phi_{onvxoлb} +$  $U\Phi_{HODMA}$ ), где  $U\Phi_{OUVXOJB}$  – интенсивность флуоресценции в зоне опухоли, а  $U\Phi_{HODMA}$  – интенсивность флуоресценции в зоне нормальных тканей. Детальный биораспределения комплексов в опухоли и нормальных органах и тканях проводился с помощью *ex vivo* флуоресцентного имиджинга спустя 3 ч после введения комплекса.

ФДТ опухолей с GdPz1 либо GdPz2

Опухоли СТ26, избирательно накопившие экзогенно введенный комплекс GdPz1 либо GdPz2 облучали однократно на 10-й день роста непрерывным лазером MGL-III-593 (CNI, Китай) (593 нм) с плотностью мощности 100 мВт/см² в течение 30 мин спустя 3 часа после введения комплекса. Фотовыгорание рассчитывали по формуле:  $(\mathcal{U}\Phi_{\partial o} - \mathcal{U}\Phi_{nocne})/\mathcal{U}\Phi_{\partial o}*100\%$ , где  $\mathcal{U}\Phi_{\partial o}$  – усреднённая интенсивность флуоресценции по площади опухоли до облучения, а  $\mathcal{U}\Phi_{nocne}$  – интенсивность флуоресценции в опухоли непосредственно после облучения. Также оценивали скорость роста опухолей и коэффициент ТРО после ФДТ.

Оценка іп vivo экспрессии в опухоли и противоопухолевой активности ОХ40Lexo

В ИБХ РАН (Москва, Россия) создан новый агент для иммунотерапии опухолей — цитокин ОХ40Lexo, секретирующийся во внеклеточную среду для лучшего привлечения эффекторных клеток к опухоли. Исследование проводили на особой флуоресцирующей опухолевой модели СТ26, коэкспрессирующей ОХ40Lexo и зелёный флуоресцентный белок EGFP. В ходе исследования проводили *in vivo* флуоресцентный имиджинг животных с опухолью, оценивали усреднённую и интегральную интенсивность флуоресценции опухолей, анализировали прививаемость и скорость роста СТ26, СТ26-EGFP и СТ26-EGFP-ОХ40L первично и вторично привитых опухолей. Кроме того, для подтверждения формирования иммунологической памяти проводили адоптивный перенос иммунитета с помощью суспензии клеток селезёнки. Селезёнки стерильно забирали непосредственно после умерщвления доноров, суспендировали, и полученную суспензию вводили интактным животным внутрибрюшинно в дозе 2х10<sup>7</sup> клеток. Спустя три дня мышам-реципиентам подкожно вводили 2х10<sup>5</sup> СТ26-EGFP опухолевых клеток и оценивали прививаемость опухолей.

Исследование иммуногенности красного флуоресцентного белка KillerRed

KillerRed создан в ИБХ РАН (Москва, Россия) и представляет собой генетическикодируемый красный флуоресцентный белок (возб. 585 нм, эмиссия 610 нм). В ходе работы оценивали прививаемость и скорость роста CT26 и CT26-KR опухолей, а также интегральную интенсивность флуоресценции по площади СТ26-КК опухоли. Кроме того, анализировали прививаемость и рост повторно привитых опухолей, для чего у мышей с СТ26 либо с СТ26-KR опухолью на 9-й день роста опухоли хирургически удалялись, и спустя 21 день животным в противоположное бедро прививались CT26 или CT26-KR опухоли в той же дозе. Оценивали усреднённую интенсивность флуоресценции исходно и повторно привитых CT26-KR опухолей. Для индукции метастазов в лёгких интактным мышам и мышам с ранее удалённой СТ26-КР опухолью внутривенно в хвостовую вену вводили смесь по  $5x10^4$  CT26 и CT26-KR клеток (1:1). Подсчёт количества лёгочных метастазов проводили макроскопически, результаты верифицировались с помощью ех vivo флуоресцентного имиджинга лёгких непосредственно после извлечения. В ходе проведения иммуномодулирующей терапии опухоли СТ26-КР животным на 5-й либо 7-й день роста опухоли внутрибрюшинно вводили циклофосфан в малой (50 мг/кг) либо терапевтической (150 мг/кг) дозе. Оценивали скорость роста опухолей и выживаемость мышей методом Каплана-Мейера, а также усреднённую интенсивность флуоресценции опухолей.

ФДТ KillerRed-экспрессирующих опухолей

обладает выраженными фототоксическими свойствами. продемонстрированными на культурах клеток (Bulina et al, 2006; Serebrovskaya et al, 2011; Kuznetsova et al, 2015) и опухолях животных (Shirmanova et al, 2013). Для облучения опухолей использовали непрерывный лазер MGL-III-593 (CNI, Китай) (593 нм) либо импульсный лазер (LOTIS TII, Белоруссия) (584 нм, 10 Гц, 18 нс). Для оценки фотовыгорания белка KillerRed опухоли облучали с помощью непрерывного лазера при плотности мощности 110, 150, 260 или 320 мВт/см<sup>2</sup> либо с помощью импульсного лазера при 225 мВт/см<sup>2</sup> в течение интервала времени от 5 до 30 мин. Температуру поверхности кожи опухолевого узла измеряли с помощью ИК-термографа (CEM-ThermoDiagnostics, CEMTechnology, Россия) до и после облучения. Получали in vivo флуоресцентные изображения мышей с опухолью до и после облучения. Фотовыгорание для каждой временной точки рассчитывали формуле:  $(И\Phi_0 - U\Phi_N)/U\Phi_0*100\%$ , где  $U\Phi_0 - U\Phi_N$ усреднённая интенсивность флуоресценции по площади опухоли до облучения, а  $И\Phi_N$  – интенсивность флуоресценции в опухоли в искомой временной точке после облучения. Для проведения ФДТ с KillerRed опухоли облучали раз в день в течение трёх дней, начиная с 6-го дня роста опухоли, 30 мин при 150 мВт/см<sup>2</sup> и 270 Дж/см<sup>2</sup> в непрерывном режиме либо 25 мин при 225 мВт/см<sup>2</sup> и 337 Дж/см<sup>2</sup> в импульсном режиме. Спустя 24 ч после ФДТ проводили патоморфологический анализ опухолевых узлов после ФДТ. Кроме того оценивали рост опухолей и коэффициент ТРО после ФДТ.

Патоморфологический анализ

Для получения гистологических препаратов опухоли после ФДТ забирали спустя 24 часа после последнего сеанса облучения, фиксировали в 10% нейтральном формалине, по общепринятой методике изготавливали парафиновые срезы толщиной 4 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином. Подсчёт опухолевых клеток проводился в пяти произвольно выбранных полях размером 0.01 мм² при 400кратном увеличении.

Статистический анализ

Статистически значимые отличия определяли в программе StatSoft STATISTICA 10 с помощью U-критерия Манна-Уитни либо точного теста Фишера, где необходимо.  $P \le 0.05$  считалось статистически значимым. Все данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

Глава 3 содержит изложение и обсуждение результатов исследования.

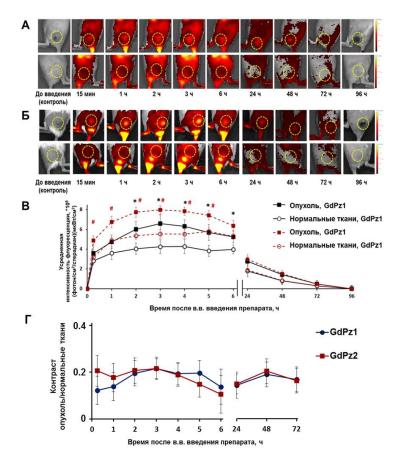
## 1. Исследование биораспределения двух новых порфиразиновых комплексов гадолиния и оценка эффективности ФДТ с использованием комплексов методом *in vivo* флуоресцентного имиджинга.

1.1. Исследование динамики накопления двух новых порфиразиновых комплексов гадолиния в опухоли и нормальных тканях методом in vivo флуоресцентного имиджинга.

Как потенциальные фотосенсибилизаторы в работе были исследованы два новых флуоресцирующих металлорганических комплекса — порфиразиновых комплекса гадолиния GdPz1 и GdPz2. Избирательность накопления новых комплексов GdPz1 и GdPz2 анализировали с помощью *in vivo* флуоресцентного имиджинга.

Установлено, что спустя 6 часов после инъекции GdPz1 или GdPz2 значительный флуоресцентный сигнал регистрировался во всём теле животного, что указывало на циркуляцию препарата в кровотоке, накопление в коже, в опухоли и в органах брюшной полости (Рис. 1A, 1Б). Спустя 24 ч флуоресценция значительно снизилась в опухоли и в нормальных тканях, однако сигнал флуоресценции в зоне опухоли был выше и, спустя 96 ч после инъекции интенсивность флуоресценции упала до базового уровня (до введения), свидетельствуя о полном выведении комплекса из организма.

избирательного результате накопления комплексов опухоли флуоресценции в данной области был значительно выше по сравнению с нормальными тканями. Установлено, что в случае GdPz1 флуоресцентный сигнал в опухоли достигал максимума спустя 3 часа после введения контрастного агента. Интенсивность флуоресценции в зоне опухоли и нормальных тканей составила, соответственно,  $6.6\pm0.8\times10^8$  и  $4.3\pm0.7\times10^8$  (фотон/сек/см<sup>2</sup>/стерадиан)(мкмВт/см<sup>2</sup>) (Рис 1В). В случае же GdPz2 максимум накопления наблюдался в период с 2 до 4 часов после введения агента. Интенсивность флуоресценции в зоне опухоли и нормальных тканей спустя 3 часа после соответственно,  $8.3\pm0.4\times10^{8}$  $5.4\pm0.4\times10^{8}$ составила, И  $(\phi o T o H/cek/cm^2/c T e p a д u a H)(M k M B T/cm^2).$ 



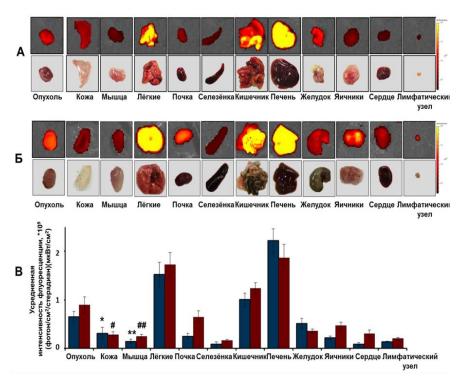
In vivo флуоресцентные изображения мыши до и в различных временных точках после введения GdPz1 (A) либо GdPz2 (B). (B) Количественный анализ усреднённой интенсивности флуоресценции опухоли и зоне нормальных тканей после введения GdPz1 или GdPz2 (из значений вычитали базовые значения автофлуоресценции тканей введения препарата), (n=7).\*Статистически значимые отличия между группами «Опухоль, GdPz1» и «Нормальные ткани, GdPz1»,  $P \le 0.03$ ; #между группами «Опухоль, GdPz2» и «Нормальные ткани, GdPz2»,  $P \le 0.02$ . (U-критерий Манна-Уитни) Зависимость значений контраста опухоль/нормальные ткани от времени после введения GdPz1 либо GdPz2, (n=7).

Значение контраста опухоль/нормальные ткани для комплекса GdPz1 в максимуме накопления (3 ч после введения) составило 0.22, в случае же GdPz2 в период максимального накопления (2-4 ч после введения) значение контраста колебалось в пределах от 0.2 до 0.22, достигая наибольшего значения спустя 3 часа после введения препарата. Спустя 24 ч, 48 ч и 72 ч значение контраста для обоих комплексов было более высоким, нежели в первые часы после введения, достигая максимума спустя 48 ч после введения и составляя 0.28 для GdPz1 и 0.3 для GdPz2.

Таким образом, данные *in vivo* флуоресцентного имиджинга демонстрируют избирательное накопление новых порфиразиновых комплексов гадолиния в опухоли. Установлено, что спустя 3 ч после введения GdPz1 либо GdPz2 наблюдается наибольшая интенсивность сигнала флуоресценции комплекса в зоне опухоли в сочетании с контрастом опухоль/нормальные ткани 0.22.

1.2. Детальный анализ биораспределения новых порфиразиновых комплексов гадолиния в опухоли и нормальных тканях методом ех vivo флуоресиентного имиджинга.

*Ex vivo* флуоресцентный имиджинг позволяет оценить детальное биораспределение комплексов в органах и тканях животного. Установлено, что наибольший сигнал флуоресценции комплексов наблюдался в печени, в лёгких и в кишечнике, что связано с интенсивным кровоснабжением печени и лёгких, а также основным путём выведения препарата из организма животного через кишечник. Наименьший сигнал флуоресценции наблюдался в мышцах, почках, селезёнке, яичниках, сердце и лимфоузлах в случае GdPz1, и в мышцах, селезёнке, желудке, сердце и лимфоузлах в случае GdPz2.



**Рис 2**. *Ex vivo* флуоресцентные изображения опухоли внутренних органов после введения GdPz1 (A) либо GdPz2 (Б) спустя 3 ч после инъекции. (В) Количественный анализ усреднённой интенсивности флуоресценции по площади опухолевого узла внутренних органов (из значений вычитали базовые значения автофлуоресценции опухолевых узлов и органов у мышей без введения комплекса), (n=3).

\*Статистически значимое отличие между группами «Опухоль, GdPz1» и «Кожа, GdPz1», P=0.0372; <sup>#</sup>между группами «Опухоль, GdPz2» и «Кожа, GdPz2», P=0.0102; \*\*между группами «Опухоль, GdPz1» и «Мышца, GdPz1», P=0.00963; <sup>##</sup>между группами «Опухоль, GdPz2» и «Мышца, GdPz2», P=0.0126 (U-критерий Манна-Уитни).

Обнаружено, что интенсивность флуоресцентного сигнала в опухолевых узлах, накопивших GdPz1 либо GdPz2, была статистически значимо выше  $(6.5\pm1.1\times10^8$  и  $8.9\pm1.6\times10^8$  (фотон/сек/см²/стерадиан)(мкмВт/см²) соответственно), нежели в окружающих нормальных тканях – коже  $(3.1\pm1.2\times10^8$  и  $2.8\pm0.6\times10^8$  соответственно) и мышцах  $(1.4\pm0.4\times10^8$  и  $2.5\pm0.4\times10^8$  соответственно), как результат избирательного

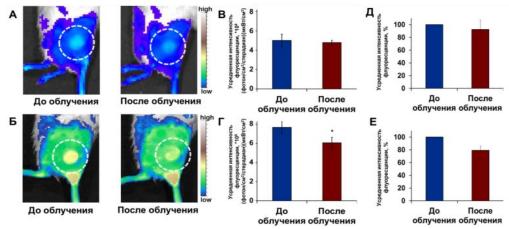
накопления комплекса в опухоли. Соотношения интенсивности сигнала флуоресценции в опухолевом узле и в коже (опухоль/кожа) и в опухолевом узле и в мышце (опухоль/мышца) для GdPz1 составляли 2.1 и 4.5 соответственно, в случае же GdPz2 – соответственно 3.1 и 3.6.

Таким образом, данные *ex vivo* флуоресцентного имиджинга подтверждают избирательное накопление GdPz1 и GdPz2в опухолевом узле.

1.3. Исследование эффективности ФДТ опухолей с новыми порфиразиновыми комплексами гадолиния с использованием in vivo флуоресцентного имиджинга.

В ходе исследования фототоксических свойств новых порфиразиновых комплексов проводили оценку фотовыгорания комплексов в опухоли после ФДТ, а также оценку скорости роста опухолей после ФДТ.

В случае ФДТ с GdPz1 не было выявлено статистически значимых отличий в интенсивности флуоресцентного сигнала до и после облучения. В то же время облучение опухолей после введения GdPz2 приводило к снижению интенсивности сигнала флуоресценции в зоне опухоли на 20% (P=0.034), что указывало на протекание реакции фотосенсибилизации (Рис 3Б, 3В).



**Рис 3**. *In vivo* флуоресцентные изображения мыши после введения GdPz1 (A) или GdPz2 (Б) до и непосредственно после облучения. Количественный анализ усреднённой интенсивности флуоресценции в опухоли после введения GdPz1 (В, Д) либо GdPz2 (Г, Е) до и после облучения, (n=7). \*Статистически значимое отличие между группами «GdPz2, До облучения» и «GdPz2, После облучения», P=0.034.

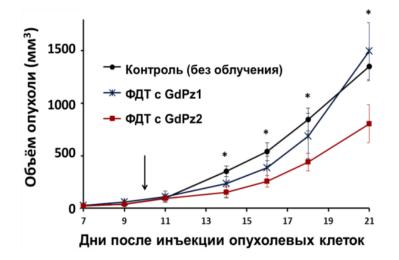


Рис 4. Влияние ФДТ с GdPz1 либо GdPz2 на рост СТ26 опухолей у Balb/c мышей, (n=7).ΦЛТ 10 после проводили на день опухолевых клеток инъекции (показано стрелкой). \*Статистически значимые отличия между группами «Контроль (без облучения)» и «ФДТ с GdPz2», *P*≤0.027 (U-критерий Манна-Уитни).

Кроме того,  $\Phi$ ДТ СТ26 опухолей с GdPz1 не оказывала влияния на рост опухолей, тогда как  $\Phi$ ДТ с GdPz2 приводила к умеренному ингибированию роста опухолей, с наиболее выраженной разницей по сравнению с контрольными опухолями без

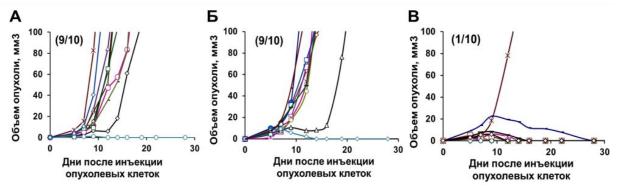
воздействий на 21 день роста опухолей, 11 дней спустя после облучения (ТРО=36.4%) (Рис 4).

Таким образом, данные, полученные в ходе анализа фотовыгорания и скорости роста опухолей после ФДТ с новыми порфиразиновыми комплексами гадолиния, указывают на то, что GdPz2 обладает выраженными фототоксическими свойствами.

# 2. Оценка прижизненной экспрессии в опухоли и противоопухолевой активности нового иммуностимулирующего цитокина OX40Lexo путём визуализации зелёного флуоресцентного белка EGFP, коэкспрессирующегося с OX40Lexo.

В настоящей работе ОХ40Lexo, секретирующийся во внеклеточную среду, генетически закодирован в раковых клетках и коэкспрессируется с EGFP. С одной стороны, это позволяет с помощью флуоресцентного имиджинга прижизненно контролировать экспрессию ОХ40L и осуществлять мониторинг опухолевого роста и регрессии. С другой стороны, известно, что EGFP обладает иммуногенными свойствами и может выступать в роли дополнительного опухолевого антигена. В данном исследовании молекула ОХ40Lexo не слита с Fc-фрагментом иммуноглобулина G1, как в остальных исследованиях, что даёт возможность изучить непосредственное влияние лиганда на опухолевые клетки без эффекта от иммуноглобулина.

Обнаружено, что экспрессия OX40Lexo в опухолевых клетках приводит к ингибированию роста опухолей у мышей. Прививаемость CT26-EGFP-OX40Lexo опухолей составляла 10% (1 из 10 мышей), в то время как прививаемость CT26-EGFP опухолей либо немодифицированных CT26 опухолей составляла 90% (9 из 10 мышей) (Рис. 5). Причём, в группе «CT26-EGFP-OX40Lexo» у 8 мышей из 10 начинали развиваться опухоли, однако 7 опухолей регрессировали к 12-28 дню после инъекции опухолевых клеток (Рис. 5В).



**Рис 5**. Динамика роста CT26 (A), CT26-EGFP (Б) и CT26-EGFP-OX40Lexo (В) опухолей, подкожная инъекция  $2x10^5$  опухолевых клеток (n=10). Прививаемость указана на графиках в скобках.

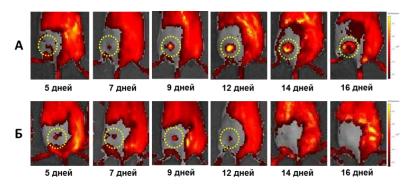
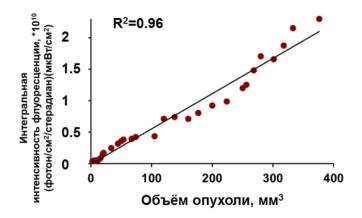


Рис 6. *In vivo* флуоресцентные изображения мыши с развивающейся CT26-EGFP (A) и регрессирующей CT26-EGFP-OX40Lexo (Б) опухолью. Срок после подкожной инъекции опухолевых клеток указан под изображениями.

Наличие флуоресцентного сигнала от EGFP в опухолевом узле подтверждает экспрессию OX40Lexo опухолевыми клетками (Рис. 6).

Продемонстрировано высокое соответствие интегральной интенсивности флуоресценции опухоли ее объему, рассчитанному на основе внешних размеров узла (коэффициент корреляции Пирсона составил 0.96) (Рис. 7). Вследствие этого, данные о внешних размерах опухоли могут быть верифицированы с помощью результатов *in vivo* флуоресцентного имиджинга.



**Рис. 7.** Корреляция интегральной интенсивности флуоресцентного сигнала по площади опухоли и объема опухоли, рассчитанного на основе внешних размеров опухолевого узла  $(R^2 -$ коэффициент корреляции Пирсона).

**Таблица 1.** Повторная прививаемость CT26-EGFP опухолей (подкожная инъекция  $5 \times 10^5$  клеток) у мышей с ранее привитой опухолью.

Исходная и	Повторная прививаемость	
CT26-EGFP, 2х10 <sup>5</sup> клеток	мыши со сформировавшейся опухолью	3 (3), 100%
	мыши с регрессировавшей опухолью	1 (5), 20%
CT26-EGFP-OX40Lexo, 2x10 <sup>5</sup> клеток	мыши со сформировавшейся опухолью	1 (1), 100%
	мыши с регрессировавшей опухолью	0 (2), 0%
CT26-EGFP-OX40Lexo, 5х10 <sup>5</sup> клеток	мыши со сформировавшейся опухолью	3 (4), 75%
	мыши с регрессировавшей опухолью	0 (4), 0%

Установлено, что у мышей со сформировавшейся опухолью повторно привитые CT26-EGFP опухоли также развиваются, в то время как у всех мышей с регрессировавшей CT26-EGFP-OX40Lexo опухолью повторно привитые CT26-EGFP опухоли не развивались, что указывает на формирование иммунологической памяти (Таблица 1).

**Таблица 2.** Прививаемость CT26-EGFP опухолей у мышей после адоптивного переноса иммунитета.

Доноры клеток селезёнки	Прививаемость CT26-EGFP опухоли (подкожная инъекция 2x10 <sup>5</sup> клеток)	
Интактные мыши	7 (15), 46.7%	
Мыши с СТ26 опухолью	5 (10), 50%,	
Мыши с CT26-EGFP опухолью	2 (6), 33.3%	
Мыши с регрессировавшей CT26-EGFP- OX40Lexo опухолью	0 (20), 0%*	

<sup>\*</sup>Статистически значимые отличия между группой «Мыши с регрессировавшей СТ26-EGFP-OX40Lexo опухолью» и остальными группами,  $P \le 0.0462$  (точный тест Фишера).

Кроме того, в качестве дополнительного доказательства формирования иммунологической памяти проводился адоптивный перенос иммунитета с помощью клеток селезёнки (Таблица 2). Обнаружено, что все мыши (20 из 20), получившие

внутрибрюшинную инъекцию от доноров с регрессировавшей CT26-EGFP-OX40Lexo опухолью, демонстрировали устойчивость к развитию CT26-EGFP опухолей. В то же время прививаемость CT26-EGFP опухолей составила 47% (7 из 15) в случае адоптивного переноса от интактных мышей, и 50% (5 из 10) либо 33% (2 из 6) в случае, когда донорами выступали мыши с CT26 или CT26-EGFP опухолью.

Таким образом, показано, что экспрессия OX40Lexo опухолевыми клетками приводит к регрессии опухолей, а также к формированию иммунологической памяти.

### 3. Исследование иммуногенности красного флуоресцентного белка KillerRed в опухоли у мышей с использованием *in vivo* флуоресцентного имиджинга.

В процессе исследования иммуногенных свойств нового красного флуоресцентного белка KillerRed, показано, что CT26-KR опухоли демонстрируют, в целом, более низкую прививаемость (85 против 100%) (Таблица 3), более медленный рост и больший разброс в размерах опухолевых узлов на поздних этапах развития опухолей (Рис. 9) по сравнению с немодифицированными CT26 опухолями.

**Таблица 3**. Прививаемость СТ26 и СТ26-KR опухолей.

	CT26	CT26-KR
Исходная прививаемость при инъекции $1x10^6$ клеток	13(13), 100%	22(26), 85%
Исходная прививаемость при инъекции 5x10 <sup>5</sup> клеток	21(21), 100%	22(25), 88%
Повторная прививаемость при инъекции $5x10^5$ клеток мышам с ранее удалённой СТ26-KR опухолью	7(9), 78%	3(7), 43%*
Повторная прививаемость при инъекции $5x10^5$ клеток мышам с ранее удалённой СТ26 опухолью	7(8), 87.5%	8(10), 80%

<sup>\*</sup>Статистически значимые отличия между группами «Исходная прививаемость при инъекции  $5x10^5$  CT26-KR клеток» и «Повторная прививаемость при инъекции  $5x10^5$  CT26-KR клеток мышам с ранее удалённой CT26-KR опухолью», P=0.0239 (точный тест Фишера).

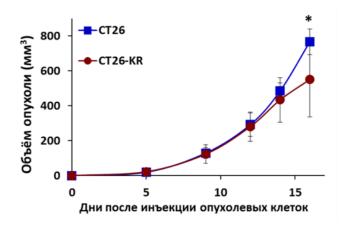
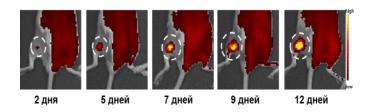


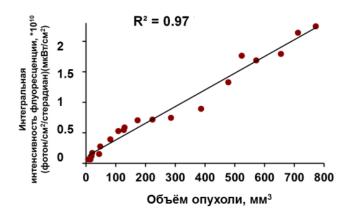
Рис 9. Динамика роста исходно привитых СТ26 и СТ26-КR опухолей (подкожная инъекция  $1 \times 10^6$  клеток), (n=7). \*Статистически значимое отличие между СТ26 и СТ26-КR опухолями, P=0.0451 (Uкритерий Манна-Уитни).

Наличие флуоресцентного сигнала от KillerRed в опухолевом узле подтверждает экспрессию белка опухолевыми клетками в течение всего срока наблюдения (Рис. 10).



**Рис** 10. *In vivo* флуоресцентные изображения мыши с CT26-KR опухолью (инъекция  $1x10^6$  клеток). Срок после подкожной инъекции опухолевых клеток указан под изображениями.

Продемонстрировано высокое соответствие интегральной интенсивности флуоресценции опухоли ее объему, рассчитанному на основе внешних размеров узла (коэффициент корреляции Пирсона составил 0.97) (Рис. 11). Вследствие этого, данные о внешних размерах опухоли могут быть верифицированы с помощью результатов *in vivo* флуоресцентного имиджинга.



**Рис. 11.** Корреляция интегральной интенсивности флуоресцентного сигнала по площади опухоли и объема опухоли, рассчитанного на основе внешних размеров опухолевого узла  $(R^2 -$ коэффициент корреляции Пирсона).

Установлено, что мыши с хирургически удалённой СТ26-КR опухолью демонстрируют ингибирование роста повторно привитых СТ26-КR опухолей (43% мышей) (Рис. 12) либо полную устойчивость к формированию опухолей (57% мышей) (Таблица 3).

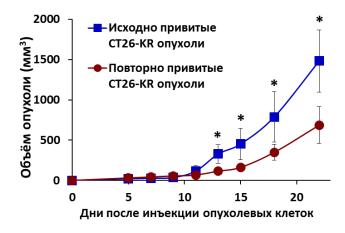
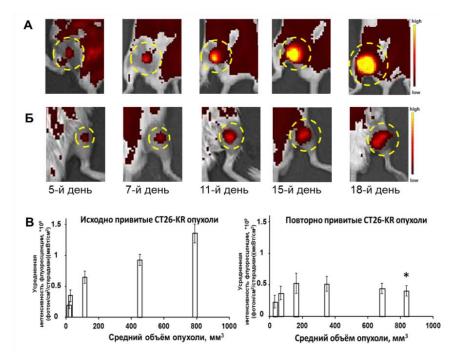


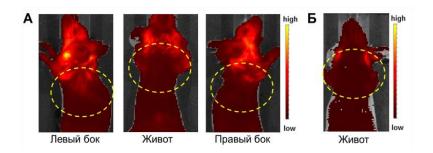
Рис 12. Динамика роста исходно и повторно привитых СТ26-КR опухолей (подкожная инъекция  $5 \times 10^5$  клеток), (n = 7). \*Статистически значимое отличие между исходно и повторно привитыми СТ26-КR опухолями,  $P \le 0.0339$  (Uкритерий Манна-Уитни).

На Рис. 13В представлены зависимости интенсивности флуоресценции исходно либо повторно привитых СТ26-КR опухолей от среднего объема опухолей в группе на определённые дни роста. Обнаружено, что интенсивность флуоресценции повторно привитых СТ26-КR опухолей была намного ниже, чем у исходно привитых СТ26-КR опухолей соответствующего объема на поздней стадии роста. Предположительно, данное явление связано с уменьшением числа KillerRed-экспрессирующих клеток в повторно привитых опухолях вследствие уничтожения их иммунной системой.



**Рис 13**. *In vivo* флуоресцентные изображения мыши с исходно (А) либо повторно (Б) привитой CT26-KR опухолью. Срок после подкожной инъекции опухолевых клеток указан под изображениями. (В) Зависимость vсредненной интенсивности флуоресценции опухолей объема опухолей, (n=7).\*Статистически значимые отличия группами между «Исходно привитые опухоли, объём опухолей 776.3±299.8  $MM^3$ » «Повторно привитые И опухоли, объём опухолей  $836.2\pm248.8 \text{ mm}^3$ », P=0.00113.

Анализ формирования индуцированных СТ26-КR метастазов в лёгких проводился у мышей с ранее удалённой СТ26-КR опухолью, а также у интактных мышей, после внутривенного введения им смеси СТ26 и СТ26-КR опухолевых клеток (1:1). В ходе работы осуществлялась попытка *in vivo* флуоресцентной визуализации Killer-Red экспрессирующих метастазов в лёгких у мышей (Рис. 14).



**Рис 14**. *In vivo* флуоресцентный имиджинг мыши спустя 21 день после внутривенного введения смеси СТ26 и СТ26-КR клеток (A) и контрольного животного без введения опухолевых клеток (Б).

К сожалению, в области лёгких не было зарегистрировано никакого значительного флуоресцентного сигнала, и значения интенсивности флуоресценции в данной области у мышей после внутривенного введения опухолевых клеток не отличались от значений автфлуоресценции нормальных тканей в области лёгких у контрольных животных без введения опухолевых клеток.

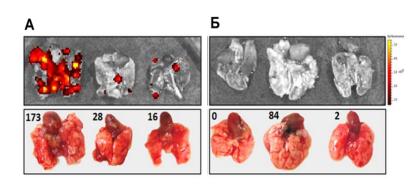


Рис 15. Метастазы в лёгких после внутривенной инъекции смеси  $5x10^4$  CT26 и  $5x10^4$  CT26-KR клеток интактным мышам (A) и мышам с ранее удалённой CT26-KR опухолью (Б). *Ex vivo* флуоресцентные изображения и фотографии лёгких. Число метастазов указано на фото.

С использованием *ex vivo* флуоресцентного имиджинга установлено, что после внутривенной инъекции смеси СТ26 и СТ26-КR клеток у интактных мышей в лёгких формируются метастазы, содержащие оба типа клеток, в то время как в лёгких мышей с

ранее удалённой CT26-KR опухолью не было зарегистрировано флуоресценции от KillerRed, и количество метастазов было значительно меньше (Рис. 15).

Известно, терапия c использованием малых ДО3 противоопухолевых что химиопрепаратов обладает иммуномодулирующим действием. Данный эффект был продемонстрирован для циклофосфана (Castano et al., 2008), винкристина, паклитаксела, налтрексона и некоторых других препаратов (Levine et al., 1996). В настоящей работе на опухолевой модели CT26-KR была апробирована использованием малой дозы циклофосфана. Как и ожидалось, терапия с использованием циклофосфана приводила к ингибированию роста СТ26-КК опухолей. На 22-й день роста опухолей коэффициент ТРО составил 69% и 54% при использовании малой (50 мг/кг) и терапевтической (150 мг/кг) дозы циклофосфана соответственно (Рис 16).

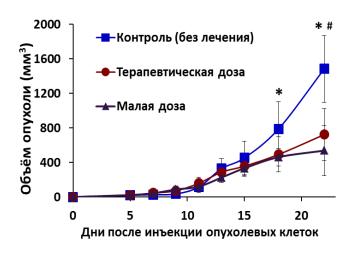
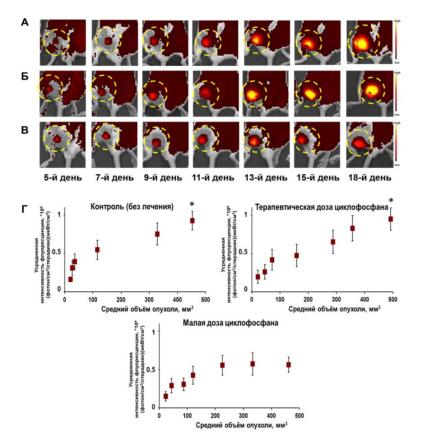


Рис 16. Динамика роста СТ26-КR опухолей без воздействий, после терапии с использованием малой либо терапевтической дозы циклофосфана, (n=7). \*Статистически значимые отличия между группами «Контроль (без лечения)» и «Малая доза»,  $P \le 0.0233$ ; \*между группами «Без воздействий» и «Терапевтическая доза», P = 0.0274 (U-критерий Манна-Уитни).

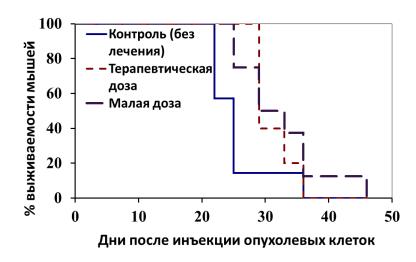


**Рис 17**. *In vivo* флуоресцентные изображения мыши с опухолью «Контроль группы лечения)» (А), «Терапевтическая доза циклофосфана» (Б) либо «Малая доза циклофосфана» (В). Зависимость усредненной флуоресценции интенсивности CT26-KR опухолей от среднего объема опухолей, (n=7).\*Статистически значимая разница между группами «Малая доза, объём опухолей 461.4±96.2  $MM^3$ «Контроль (без лечения)»; между группами «Малая доза» «Терапевтическая доза»,  $P \le 0.001$ (U-критерий Манна-Уитни).

Установлено, что при объёме опухолей свыше 400 мм<sup>3</sup> средняя интенсивность флуоресценции опухолей в группе «Малая доза циклофосфана» существенно ниже интенсивности флуоресценции опухолей в группах «Контроль (без лечения)» и

«Терапевтическая доза циклофосфана» соответствующего объема (Рис 17). Так как использование малой дозы циклофосфана имеет иммуномодулирующее действие, снижение интенсивности сигнала флуоресценции предположительно связано с уменьшением числа KillerRed-экспрессирующих клеток в опухолях вследствие уничтожения их иммунной системой.

Более того, использование малой дозы циклофосфана приводило к улучшению показателей выживаемости мышей по сравнению терапевтической дозой либо отсутствием лечения (Рис 18). Медиана выживаемости в группе с использованием малой дозы циклофосфана соответствует 29 дню роста опухолей. В то же время, в группе с использованием терапевтической дозой либо с отсутствием лечения выживаемость на 29-й день составляла 40% и 14.3% соответственно.



**Рис** 18. Кривые выживаемости Каплана-Мейера (n=7). Животных выводили из эксперимента по достижении опухоли объёма 1500 мм<sup>3</sup>.

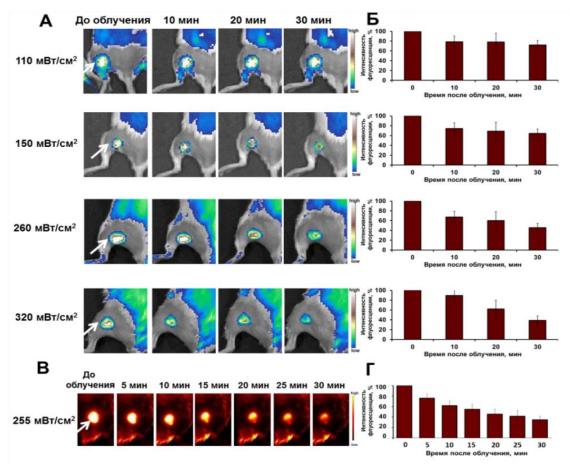
Таким образом, показаны иммуногенные свойства красного флуоресцентного белка KillerRed и возможность использования иммуногенной опухолевой модели CT26-KR для проведения комбинированной противоопухолевой терапии.

## 4. Изучение фототоксических свойств красного флуоресцентного белка KillerRed при воздействии непрерывного и импульсного лазерного излучения.

Известно, что красный флуоресцентный белок KillerRed обладает выраженными фототоксическими свойствами, однако, чтобы добиться выраженного терапевтического эффекта на опухолевой модели у мышей, в предыдущих работах использовался достаточно интенсивный режим облучения (Shirmanova et al, 2013). Следовательно, дальнейшие in vivo исследования на опухолевых моделях у иммунокомпетентных мышей требуют оптимизации параметров облучения и подбора эффективного режима ФДТ опухолей.

Для оптимизации режимов лазерного облучения важно было подобрать такие параметры лечения, чтобы достичь максимального фотовыгорания фотосенсибилизатора в опухоли при минимальном повышении температуры.

Установлено, облучение опухолей непрерывным лазером с плотностью мощности 260 либо  $320 \text{ мВт/см}^2$  позволяет добиться снижения интенсивности флуоресценции KillerRed до 60% при увеличением времени облучения до 30 мин (Рис. 20). Однако из-за значительного повышения температуры на поверхности опухоли данные плотности мощности исключены из дальнейшего рассмотрения (Таблица 4). При  $110 \text{ мВт/см}^2$  температурных эффектов обнаружено не было, однако степень выгорания белка довольно низкая — 25%, что, скорее всего, недостаточно для разрушения опухолевых клеток.



**Рис 20**. *In vivo* флуоресцентные изображения CT26-KR опухолей при облучении непрерывным (A) либо импульсным (B) лазером. Над изображениями указано время облучения. Количественная оценка снижения интенсивности флуоресценции белка в процессе облучения опухолей непрерывным (Б) либо импульсным ( $\Gamma$ ) лазером, (n=10).

Облучение же 150 мВт/см<sup>2</sup> позволяет достичь до 40% фотовыгорания KillerRed, и существенного нагрева не наблюдалось. Максимум выгорания KillerRed при облучении импульсным лазером составляет также 60%, однако достигается при меньших значениях дозы облучения (225 мВт/см<sup>2</sup>, 25 мин) без повышения температуры на поверхности опухоли. Таким образом, были отобраны два режима для ФДТ: 270 Дж/см<sup>2</sup> (150 мВт/см<sup>2</sup>, 30 мин) для лазера с непрерывным излучением и 337 Дж/см<sup>2</sup> (225 мВт/см<sup>2</sup>, 25 мин) для лазера с импульсным излучением.

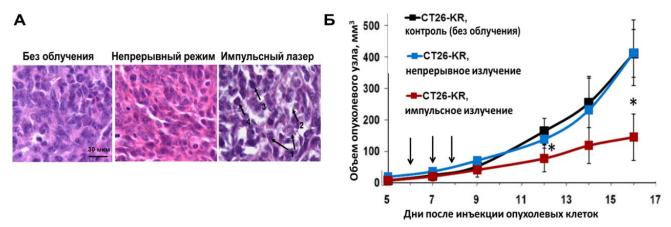
**Таблица 4**. Температура на поверхности СТ26-КR опухоли после лазерного воздействия.

Температура опухоли до облучения составляла  $31.7 \pm 1.3$ °C.

Режим	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	150 мВт/см <sup>2</sup> , непрерывный	,	320 мВт/см <sup>2</sup> , непрерывный	225 мВт/см <sup>2</sup> , импульсный
	режим	режим	режим	режим	режим
t, °C	31.4±0.9	35.1±0.9	36.9±0.2	39.5±1.2	30.7±0.5
Δt, °C	0	2.1±0.9	6.0±0.3	7.3±0.8	0

Обнаружено, что ФДТ в импульсном режиме приводило к существенным дистрофическим изменениям в опухолевых клетках. Процент дистрофически изменённых клеток увеличился до 62.8% против 17.6% в группе с необлученными СТ26-КR опухолями. Вакуолизация цитоплазмы наблюдалась у 30.8% клеток, появление крупных гиперхромных ядер — у 35.8%, конденсация хроматина — 7%, а также замечено снижение общего числа клеток в поле зрения за счёт увеличение размеров клеток вплоть до разрыва мембран. Обнаружено значительное снижение процента клеток с признаками митоза

(0.2% против 8.5% в группе «СТ26-КR, без облучения»), а также увеличение количества клеток с признаками апоптоза (8.4% против 0.9% в группе «СТ26-КR, без облучения»). ФДТ с KillerRed в непрерывном режиме не имела заметного влияния на опухолевые клетки.



**Рис 21**. (А) Гистологические изображения (H&E) СТ26-КR опухолей спустя 24 часа после ФДТ. Дистрофические изменения в клетках: 1- укрупнённые гиперхромные ядра, 2- конденсация хроматина, 3- вакуолизация цитоплазмы, 4- признаки апоптоза (показано стрелками). (Б) Динамика роста СТ26-КR опухолей у мышей после ФДТ, (n=7). ФДТ проводили на 6, 7 и 8-й дни после инъекции опухолевых клеток (показано стрелками). \*Статистически значимое отличие по сравнению с контрольной группой «СТ26-КR, контроль (без облучения)»,  $P \le 0.01$ .

Анализ динамики роста CT26-KR опухолей показал, что ФДТ опухолей в импульсном режиме способствует ингибированию роста опухолей у мышей (TPO=62.4% на 16-й день роста) (Рис. 21). Облучение CT26-KR опухолей непрерывным лазером, напротив, не оказывает никакого влияния на скорость роста опухолей.

Таким образом, впервые проведено сравнительное исследование фототоксических свойств генетически-кодируемого фотосенсибилизатора KillerRed в опухоли у мышей при воздействии непрерывного и импульсного лазерного излучения и подобран эффективный режим ФДТ с KillerRed опухолей у мышей с использованием импульсного излучения.

#### **ВЫВОДЫ**

- 1. Методом *in vivo* флуоресцентного имиджинга показано, что порфиразиновые комплексы гадолиния GdPz1 и GdPz2 избирательно накапливаются в опухоли. В случае GdPz1 максимальная интенсивность сигнала флуоресценции комплекса в зоне опухоли в сочетании с контрастом опухоль/нормальные ткани 0.22 наблюдается спустя 3 ч после внутривенного введения комплекса, в случае GdPz2 в период с 2 до 4 ч после введения.
- 2. Установлено, что комплекс GdPz2 проявляет выраженные фототоксические свойства, отражающиеся в снижении интенсивности флуоресценции комплекса в опухоли после облучения на 20% и торможении роста опухолей после ФДТ TPO=36.4% на 21 день роста опухолей.
- 3. Показана возможность прижизненной визуализации экспрессии нового иммуностимулирующего цитокина OX40Lexo в модельной опухоли, коэкспрессирующей EGFP и OX40Lexo. Установлено, что экспрессия OX40Lexo в опухоли приводит к регрессии 90% опухолей и развитию иммунологической памяти.
- 4. С помощью *in vivo* флуоресцентного имиджинга продемонстрирована иммуногенность красного флуоресцентного белка KillerRed, выражающаяся в снижении прививаемости и замедленном росте CT26-KR опухолей по сравнению с CT26 опухолями, в устойчивости к формированию повторно привитых CT26-KR опухолей и метастазов у мышей с ранее

- удалённой СТ26-KR опухолью и в снижении интенсивности флуоресценции повторно привитых опухолей СТ26-KR, а также снижение интенсивности флуоресценции и торможение роста СТ26-KR опухолей TPO=69% на 22 день роста опухолей, после иммуномодулирующей терапии с применением циклофосфана.
- 5. Установлено, что импульсный режим облучения опухолей способствует достижению максимума фотовыгорания KillerRed на 60% при меньшей световой дозе и отсутствии температурных эффектов по сравнению с непрерывным режимом. Показано увеличение процента дистрофически изменённых клеток до 62.8% против 17.6% в группе с необлученными СТ26-КR опухолями и ингибирование роста опухолей ТРО=62.4% на 16 день роста опухолей, в результате ФДТ в импульсном режиме (584 нм, 10 Гц, 18 нс, 25 мин, 225 мВт/см², 337 Дж/см², раз в сутки в течение 3-х дней).

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

- 1. **Yuzhakova DV**, Lermontova SA, Grigoryev IS, Muravieva MS, Gavrina AI, Shirmanova MV, Balalaeva IV, Klapshina LG, Zagaynova EV. In vivo multimodal tumor imaging and photodynamic therapy with novel theranostic agents based on the porphyrazine framework-chelated gadolinium (III) cation // Biochim Biophys Acta. 2017. V. 1861(12). P. 3120-3130.
- 2. Gavrina AI, Shirmanova MV, Aksenova NA, **Yuzhakova DV**, Snopova LB, Solovieva AB, Timashev PS, Dudenkova VV, Zagaynova EV. Photodynamic therapy of mouse tumor model using chlorin e6- polyvinyl alcohol complex // J Photochem Photobiol B. 2018. V. 178. P. 614-622.
- 3. Shirmanova MV, **Yuzhakova DV**, Snopova LB, Perelman GS, Serebrovskaya EO, Lukyanov KA, Turchin IV, Subochev P, Lukyanov SA, Kamensky VA, Zagaynova EV. Towards PDT with Genetically Encoded Photosensitizer KillerRed: A Comparison of Continuous and Pulsed Laser Regimens in an Animal Tumor Model // PLoS One. 2015. V. 10(12). P. e0144617.
- 4. Serebrovskaya EO, **Yuzhakova DV**, Ryumina AP, Druzhkova IN, Sharonov GV, Kotlobay AA, Zagaynova EV, Lukyanov SA, Shirmanova MV. Soluble OX40L favors tumor rejection in CT26 colon carcinoma model // Cytokine. 2016. V. 84. P. 10-6.
- 5. **Yuzhakova DV**, Shirmanova MV, Serebrovskaya EO, Lukyanov KA, Druzhkova IN, Shakhov BE, Lukyanov SA, Zagaynova EV. CT26 murine colon carcinoma expressing the red fluorescent protein KillerRed as a highly immunogenic tumor model // Journal of Biomedical Optics. 2015. V. 20(8). P. 088002.
- 6. **Южакова** Д**B**, Ширманова МВ, Сергеева ТФ, Загайнова ЕВ, Лукьянов КА. Иммунотерапия злокачественных новообразований (обзор) // Современные технологии в медицине. 2016. Т. 8(1). С. 173–182.

#### Патенты на изобретение:

1. Клапшина ЛГ, Лермонтова СА, Пескова НН, Балалаева ИВ, Шилягина НЮ, Ширманова МВ, Гаврина АИ, **Южакова ДВ.** Порфиразин, порфиразиновый комплекс гадолиния и их применение // Патент РФ № 2621710 от 26.08.2016.

#### Тезисы конференций:

- 1. **Южакова ДВ**, Серебровская КО, Дружкова ИН, Лермонтова СА, Гаврина АИ, Ширманова МВ. *In vivo* флуоресцентный имиджинг на уровне целого организма для исследования новых противоопухолевых препаратов // Материалы 71-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», Нижний Новгород, 2018. С. 255.
- 2. **Yuzhakova DV**, Shirmanova MV, Snopova LB, Serebrovskaya EO, Druzhkova IN, Perelman GS, Turchin IV, Kamensky VA, Lukyanov SA, Zagaynova EV. Phototoxic and

- immunogenic properties of the red fluorescent protein KillerRed in a mouse tumor model // Abstracts of 17th Congress of the European Society for Photobiology, Pisa, Italy, 2017. P. 129.
- 3. **Южакова** Д**B**, Перельман ГС, Серебровская КО, Дружкова ИН, Ширманова МВ. Исследование иммуногенных и фототоксичных свойств красного флуоресцентного белка KillerRed в эксперименте *in vivo* // Материалы 70-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», Нижний Новгород, 2017. С. 182.
- 4. **Yuzhakova DV**, Shirmanova MV, Serebrovskaya EO, Druzhkova IN, Lukyanov SA, Zagaynova EV. The effect of OX40 ligand on CT26 tumors in mice // Proceedings of VI International Symposium Topical Problems of Biophotonics, Saint Petersburg Nizhny Novgorod, 2017. P. 107.
- 5. **Yuzhakova DV**, Shirmanova MV, Lapkina IV, Serebrovskaya EO, Lukyanov SA, Zagaynova EV. The effect of housing temperature on the growth of CT26 tumor expressing fluorescent protein EGFP // Proc. SPIE 9917, Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS), Saratov, 2016. P. 991709.
- 6. **Yuzhakova DV**, MV Shirmanova, LB Snopova, EO Serebrovskaya, IV Turchin, SA Lukyanov, VA Kamensky, E Vasilenko, E Gorshkova, A Kruglov, SA Nedospasov, Zagaynova EV. Red fluorescent proteins KillerRed and Katushka as genetically encoded agents for *in vivo* fluorescence imaging in mouse disease models // Proceedings of 4th ESP Photobiology School, Brixen/Bressanone, Italy, 2016. P. 26.
- 7. **Yuzhakova DV**, Shirmanova MV, Serebrovskaya EO, Lukyanov KA, Druzhkova IN, Lukyanov SA, Zagaynova EV. Study of activation of the immune response against tumors expressing the fluorescent protein KillerRed // Proceedings of 7th International Graduate summer school Biophotonics '15, Island of Ven, Sweden, 2015. P. 37.
- 8. **Yuzhakova DV**, Shirmanova MV, Perelman GS, Snopova LB, Subochev PV, Kamensky VA, Serebrovskaya EO, Lukyanov SA, Zagaynova EV. Phototoxic effects of fluorescent protein KillerRed induced in a mouse tumor by pulsed laser irradiation // Proceedings of V International Symposium «Topical Problems of Biophotonics», Nizhny Novgorod Elabuga Nizhny Novgorod, 2015. P. 294-295.
- 9. **Южакова** Д**B**, Дружкова ИН, Снопова ЛБ, Проданец НН, Каменский ВА, Ширманова МВ. Морфологическое исследование воздействия импульсного лазера на опухоли СТ26, экспрессирующие генетически-кодируемый фотосенсибилизатор KillerRed // Материалы докладов IX Всероссийский Научной Конференции «Бабухинские Чтения в Орле», 2015. Журнал «Морфология». Т.147(3). С. 92-93.
- 10. **Южакова** Д**B**, Ширманова МВ, Лапкина ИВ, Рюмина АП, Серебровская ЕА, Загайнова ЕВ. Изучение влияния лиганда рецептора ОХ40 на развитие опухоли СТ26 у мышей // Сборник тезисов ХХ Нижегородской сессии молодых учёных (естественные, математические науки), пансионат «Морозовский» Нижегородской обл, 2015.С. 156-157.
- 11. **Южакова** ДВ, Ширманова МВ, Дружкова ИН, Лапкина ИВ, Рюмина АП, Серебровская ЕА. Исследование влияния цитокина суперсемейства фактора некроза опухолей ОХ40-лиганда на рост опухолей СТ26 у мышей // Материалы II Всероссийской XIII Межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов «Современные решения актуальных научных

- проблем в медицине», Нижний Новгород, 2015. Электронный журнал «МедиАль». Т. 1(15). С. 294-295.
- 12. Shirmanova MV, Kuznetsova DS, **Yuzhakova DV**, Dudenkova VV, Snopova LB, Subochev PV, Turchin IV, Kamensky VA, Serebrovskaya EO, Lukyanov SA, Zagaynova EV. Towards PDT with genetically encoded photosensitizer KillerRed: a comparison of continuous and pulsed laser regimes in 3D and animal tumor models // 2015 Technical Summaries, SPIE. Photonics West BiOS, The Moscone Center, San Francisco, California, United States, 2015. P. 120.
- 13. **Южакова ДВ**, Ширманова МВ, Дружкова ИН, Перельман ГС, Рюмина АП, Серебровская ЕА, Лукьянов СА, Загайнова ЕВ. Изучение стимуляции иммунного ответа организма против опухоли, экспрессирующей флуоресцентный белок KillerRed, малой дозой циклофосфана // Материалы VII Съезда Российского фотобиологического общества, пос. Шепси, Россия, 2014. С. 114.
- 14. **Yuzhakova DV**, Shirmanova MV, Druzhkova IN, Snopova LB, Serebrovskaya EO, Lukyanov SA, Zagaynova EV. Study of immunogenicity of the KillerRed expressing tumors // Scientific program of Russian-German Symposium "Immunology and Cancer", Russia, Nizhny Novgorod, 2014. P. 25.
- 15. **Южакова** ДВ, Ширманова МВ, Дружкова ИН, Перельман ГС, Рюмина АП, Серебровская ЕА, Лукьянов СА, Загайнова ЕВ. Исследование возможности активации противоопухолевого иммунного ответа малыми дозами циклофосфана на опухолях, экспрессирующих флуоресцентный белок KillerRed // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике" Москва, 2014. Российский Биотерапевтический Журнал. №1. Т. 13. С. 142.
- 16. Shirmanova MV, Serebrovskaya EO, Lukyanov SA, Snopova LB, Kuznetsova MM, **Uzhakova DV**, Kamensky VA, Druzhkova IN, Zagaynova EV. Photodynamic therapy with genetically encoded photosensitizers is it possible? // Proceedings of 15th Congress of the European Society for Photobiology Palais des Congrès, Liège, Belgium, 2013. P. 89.
- 17. Shirmanova MV, Snopova LB, Serebrovskaya EO, Kuznetsova MM, Sergeeva EA, Kamensky VA, **Uzhakova DV**, Lukyanov KA, Lukyanov SA, Zagaynova EV. In vivo study of genetically encoded phototoxic proteins for tumor therapy // Proceedings of International Symposium «Topical problems of biophotonics-2013», Nizhny Novgorod, 2013. P.196-197.