Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский

государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Южакова Диана Владимировна

In vivo флуоресцентный имиджинг в исследовании новых препаратов для иммуно- и фотодинамической терапии опухолей

03.01.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: д.м.н., проф. РАН Загайнова Е.В.

Нижний Новгород – 2018

оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. In vivo флуоресцентный имиджинг в экспериментальной	
ОНКОЛОГИИ	12
1.1.1. Основы <i>in vivo</i> флуоресцентного имиджинга	12
1.1.2. Преимущества и области применения <i>in vivo</i> флуоресцентного	
имиджинга в экспериментальной онкологии	15
1.2. In vivo флуоресцентный имиджинг в исследовании новых	
противоопухолевых агентов	20
1.2.1. In vivo флуоресцентный имиджинг в исследовании новых	
фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии	20
1.2.2. Флуоресцентные белки в качестве опухолевых антигенов	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1. Объекты исследования	41
2.2. Методы	42
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	48
3.1. Исследование биораспределения двух новых порфиразиновых	
комплексов гадолиния и оценка эффективности ФДТ с использованием	
комплексов методом <i>in vivo</i> флуоресцентного имиджинга	48
3.2. Оценка прижизненной экспрессии в опухоли и противоопухолевой	
активности нового иммуностимулирующего цитокина ОХ40Lexo путём	
визуализации зелёного флуоресцентного белка EGFP	
коэкспрессирующегося с ОХ40Lexo	55
3.3. Исследование иммуногенности красного флуоресцентного белка	00
KillerRed в опухоли у мышей с использованием <i>in vivo</i> флуоресцентного	
имилжинга	67
ининдленнаа	04

3.4. Изучение фототоксических свойств красного флуоресцентного белка	
KillerRed при воздействии непрерывного и импульсного лазерного	
излучения	74
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	82
ВЫВОДЫ	85
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	87

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 5-АЛА 5-аминолевулиновая кислота
- АФК активные формы кислорода
- ИФ интенсивность флуоресценции
- МРТ магниторезонансная томография
- $HAД\Phi$ никотинамидадениндинуклеотид
- ТРО коэффициент торможения роста опухолей
- ФАД флавин-адениндинуклеотид
- ФДТ фотодинамическая терапия
- ЭДТА этилендиаминтетрауксусная кислота
- DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium, среда для культивирования клеток
- EGFP Enhanced Green Fluorescent Protein, улучшенный зелёный
- флуоресцентный белок
- GFP Green Fluorescent Protein зелёный флуоресцентный белок
- Gd гадолиний
- H&E Hematoxylin and Eosin Stain, окраска гематоксилином и эозином
- MiniSOG mini Singlet Oxygen Generator, генератор синглетного кислорода
- ОХ40L лиганд рецептора CD134 (ОХ40)
- OX40Lexo лиганд рецептора CD134 (OX40), секретирующийся во
- внеклеточную среду
- Pz1 тетра-4-фтор-фенилтетрацианопорфиразин
- Pz2 тетрафенилтетрацианопорфиразин
- GdPz1 тетра-4-фтор-фенилтетрацианопорфиразиновый комплекс гадолиния
- GdPz2 тетрафенилтетрацианопорфиразиновый комплекс гадолиния
- KR красный флуоресцентный белок KillerRed
- СТ26 колоректальная аденокарцинома мышей
- CT26-KR колоректальная аденокарцинома мышей, экспрессирующая красный флуоресцентный белок KillerRed

ВВЕДЕНИЕ

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 противоопухолевых препаратов является *in vivo* флуоресцентный имиджинг. Бесспорными преимуществами данного метода являются возможность неинвазивного исследования, относительная простота и дешевизна использования в сочетании с достаточной биологической чувствительностью И 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 актуальной задачей разработке того, В 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 фотосенсибилизатора флуоресцентный сигнал В опухоли снижается непосредственно после облучения, что свидетельствует о фотовыгорании флуорофора и, соответственно, о протекании реакции фотосенсибилизации. Дозиметрия основе оценки фотовыгорания помощью in vivo на С 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 ФДТ.

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 ОХ40Lexo, продемонстрированы противоопухолевые свойства ОХ40Lexo.

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 задач по прижизненному неинвазивному исследованию инновационных противоопухолевых препаратов на уровне целого организма с помощью эпилюминисцентного флуоресцентного имиджинга. Разработаны биораспределения универсальные методики ПО изучению новых флуоресцирующих оценки фотовыгорания агентов, как химически синтезируемых, генетически-кодируемых фотосенсибилизаторов. так И 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 OX40Lexo в опухоли путём зелёного флуоресцентного белка EGFP, коэкспрессирующегося с OX40Lexo. Экспрессия OX40Lexo 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 немодифицированными по сравнению с опухолями, в устойчивости к формированию повторно привитых KillerRedэкспрессирующих опухолей и метастазов у мышей с ранее удалённой KillerRedснижении экспрессирующей опухолью, а также В 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 на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «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.); XX 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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. In vivo флуоресцентный имиджинг в экспериментальной онкологии

1.1.1. Основы in vivo флуоресцентного имиджинга

Флуоресцентный имиджинг на уровне целого организма представляет собой мощный инструмент в области биомедицинских исследований, центральное место среди которых занимает экспериментальная онкология.

В основе флуоресцентного имиджинга лежит способность некоторых молекул – флуорофоров при возбуждении светом определённой длины волны испускать флуоресценцию. Флуоресцентная визуализация тканей может основываться как на введении в организм экзогенных флуорофоров, так и на способности некоторых собственных молекул клетки флуоресцировать (автофлуоресценция) (*Berezin et al., 2010; Ballou et al., 2005; Jablonski 1933*).



Основное состояние электронов

Рис. 1. Диаграмма Яблонского. Горизонтальные линии — энергетические уровни

электронов: S_0 — основное, невозбужденное состояние; S_1 — синглетное возбужденное состояние; 0 — 3 — квантованные подуровни; T1, T2 — квантованные уровни триплетного возбужденного состояния. Стрелками показаны переходы электронов в разные энергетические состояния.

Поглощение молекулой флуорофора кванта электромагнитного излучения оптического диапазона приводит к переходу электрона из синглетного основного состояния (S_0) в синглетное возбужденное (S_1). Излучение, сопровождающее обратный переход молекулы из синглетного возбужденного состояния в основное называется флуоресценцией (Рис. 1).

Флуоресценция флуорофора характеризуется следующими параметрами: спектром поглощения и флуоресценции, квантовым выходом и временем жизни флуоресценции (*Leblond et al., 2010; Berezin et al., 2010*).

Спектром поглощения называют зависимость интенсивности поглощённого веществом излучения от длины волны (частоты), а спектром флуоресценции, соответственно, зависимость интенсивности излучения от длины волны (частоты) света. Основными параметрами спектра являются интенсивность флуоресценции, положение максимума и так полуширина (ширина спектра на уровне половины максимума. Спектр испускания флуоресценции обычно не зависит от длины волны возбуждения (правило Каши). Спектр флуоресценции сдвинут в длинноволновую область по сравнению с полосой поглощения (правило Стокса) и зеркально-симметричен ей (правило Левшина).

Квантовый выход флуоресценции – это отношение числа испускаемых фотонов к числу поглощенных. Данный параметр характеризует эффективность, с которой поглощенная энергия трансформируется в излучение по сравнению с процессами безызлучательной релаксации. Чем больше квантовый выход, тем выше интенсивность флуоресценции флуорофора.

Время жизни флуоресценции – среднее время, в течение которого молекула находится в возбужденном состоянии до того, как вернуться в

основное состояние с испусканием фотонов. Измеряют этот показатель по затуханию флуоресценции после кратковременного возбуждения. Обычно время затухания флуоресценции составляет около 10 нс.

In vivo флуоресцентный имиджинг на уровне целого организма предполагает *взаимодействие излучения с биологическими тканями объекта*. Основными процессами, описывающими взаимодействие падающего света с биологической тканью, являются отражение, поглощение, рассеяние, обратное рассеяние и пропускание (Рис. 2) (*Красников и др., 2013;Leblond et al., 2010;Tuchin 2015; Wang et al., 2007*).



Рис. 2. Взаимодействие оптического излучения с биологическим объектом: отражение, поглощение, рассеяние, обратное рассеяние и пропускание.

Отражение света биологическими тканями обусловлено разницей в показателях преломления воздуха и биообъекта. Кроме того, оно может быть также обусловлено обратным рассеянием от более глубинных слоёв ткани. В зависимости от длины волны падающего излучения отражается до 60% излучения. Так, отражение светового луча от кожи складывается из непосредственного отражения от рогового слоя, а также из рассеяния эпидермисом и дермой.

эффектом, происходящим при прохождении Другим света через биообъект, является поглощение. В биологических тканях основными поглощающими центрами (хромофорами) являются молекулы воды И биомолекулы, в частности, гемоглобин, липиды, меланин, миоглобин и цитохромы. Ультрафиолетовое излучение поглощается преимущественно молекулами нуклеиновых кислот, белков и липидов. Это ограничивает эффективное проникновение света до нескольких сотен микрон. Однако значительно более глубинные слои можно визуализировать с использованием света в дальнем красном или ближнем инфракрасном диапазоне длин волн, где основными поглощающими элементами ткани являются де-оксигемоглобин, оксигемоглобин, вода и липиды. В данной спектральной области поглощение света хромофорами по меньшей мере на один порядок ниже, чем в области видимого спектра, что даёт потенциальную возможность регистрировать сигнал флуоресценции с глубины нескольких сантиментов.

Рассеяние света в биотканях возникает за счёт изменения показателя преломления среды. Макромолекулы, внутриклеточные органеллы и внеклеточные структуры обладают различными показателями преломления. Кроме того, на рассеяние также влияет размер частиц, составляющих клетки и ткани (от нм – белки – до мкм – клетки).

Наконец, часть излучения может пройти сквозь биологическую ткань. Среди биологических тканей почти прозрачными для видимого света можно считать роговицу и хрусталик глаза (*Тучин 2013; Красников и др., 2013; Wang et al., 2007; Leblond et al., 2010*).

1.1.2. Преимущества и области применения *in vivo* флуоресцентного имиджинга в экспериментальной онкологии

In vivo флуоресцентный имиджинг на уровне целого организма обладает рядом существенных преимуществ перед другими методами. Так. флуоресцентный имиджинг даёт возможность неинвазивного длительного исследования биологических объектов. Кроме того, относительная простота и сочетаются с достаточной дешевизна использования данного метода пространственным разрешением биологической чувствительностью, И безопасностью. Наконец, прижизненная флуоресцентная визуализация на макроуровне предоставляет уникальную возможность учитывать специфику взаимодействия опухоли и организма.

In vivo флуоресцентный имиджинг на уровне целого организма позволяет проводить широкий спектр исследований в области экспериментальной онкологии, обладая рядом преимуществ перед другими методами.

Данный позволяет изучить фармакокинетику подход новых флуоресцирующих агентов, оценить их накопление в опухоли и нормальных тканях организма в динамике и пути выведения из организма. В отличие от классических методов, таких как химическая экстракция, in vivo флуоресцентный имиджинг позволяет провести неинвазивный, быстрый и недорогой мониторинг накопления нового агента в опухоли и выведения его из организма без умерщвления животных в ходе эксперимента (Kaijzel et al., 2007; Ding et al., 2012). Существует широкий ряд флуоресцирующих агентов для различный биомедицинских задач, которые требуют исследования ИХ биораспределения в организме. С одной стороны, это флуоресцентные красители и мультимодальные агенты для обнаружения опухоли ИЛИ наблюдения за её функциональными параметрами (Jiang et al., 2010; Yang et al., 2009; Vasquez et al., 2011; Shimolina et al., 2017).

С другой стороны, *in vivo* флуоресцентный имиджинг позволяет наблюдать за биораспределением терапевтических агентов, в частности, химиопрепаратов для химиотерапии опухолей, на уровне целого организма. Некоторые химиопрепараты, такие как доксорубицин, паклитаксель и блеомицин, обладают флуоресцентными свойствами (*Motlagh et al., 2016*).

Например, в работе Kanno et al. проводили визуализацию флуоресценции доксорубицина в организме для оценки его накопления опухоли в рамках радиационного воздействия исследования влияния на множественную лекарственную устойчивость (Kanno et al., 2015). Однако большинство химиопрепаратов не обладают собственной флуоресценцией, и для оценки их распределения в организме с помощью *in vivo* флуоресцентного имиджинга требуется связать их с флуоресцентной меткой (Kim et al., 2009). Так, флуоресцентные представляют интерес наночастицы для доставки химиопрепарата цисплатина (Wolfbeis et al., 2015).

Однако наибольший интерес представляет исследование распределения новых фотосенсибилизаторов для ФДТ опухолей, которые обладают собственной сильной флуоресценцией.

Другой задачей в области экспериментальной онкологии, решаемой с помощью in vivo флуоресцентного имиджинга, является оценка фотовыгорания фотосенсибилизаторов в ходе ФДТ опухолей. Известно, что флуоресцентный сигнал фотосенсибилизатора В опухоли снижается непосредственно после облучения, что свидетельствует о фотовыгорании флуорофора и, соответственно, о протекании реакции фотосенсибилизации. Преимущественно выгорание связано с атакой молекул фотосенсибилизатора кислорода (АФК) (главным образом, синглетным активными формами кислородом ¹O₂), что сопровождается их фотохимической деструкцией и Дозиметрия необратимой потерей флуоресценции. на основе оценки фотовыгорания с помощью in vivo флуоресцентного имиджинга представляет удобный, простой собой чрезвычайно И недорогой способ анализа эффективности ФДТ по сравнению с классической дозиметрией на основе оценки уровня синглетного кислорода. (Jarvi et al., 2012; Dysart et al., 2005; Sheng et al., 2007; Anbil et al., 2012; Farrell et al., 1998).

Широкое применение в области биомедицины приобрёл *мониторинг роста опухоли* и развития метастазов, а также оценка ответа опухоли на лечение с помощью *in vivo* флуоресцентного имиджинга на уровне целого организма. Не требует дорогостоящего оборудования, проста в исполнении и достаточно чувствительна. Диагностика опухоли может осуществляться с помощью флуоресцентных красителей, накапливающихся в опухоли за счёт эффекта повышенной проницаемости, таких как флюоресцеин и индоцианин зелёный (*Ewelt et al., 2015*). Среди контрастных для флуоресцентной диагностики опухоли особое место занимают флуоресцирующие ближнеинфракрасные красители (650–900 нм), за счёт значительно большей проникающей способности света в ткани животного, что обеспечивает визуализацию агентов на глубине порядка сантиметра (*Jiang et al., 2010; Nam et al., 2010; Harrison et al., 2015; Fei-Peng et al., 2016*). Подобная диагностика не требует дорогостоящего оборудования, проста в исполнении и обладает достаточной чувствительностью.

Однако наибольшего расцвета данное направление достигло благодаря GFP-подобным флуоресцентным белкам, выступающим в роли генетическикодируемых меток опухолевых клеток. Основным преимуществом опухолевых моделей, экспрессирующих флуоресцентные белки, является то, что они не требуют введения дополнительного контрастного агента (Hoffman, 2002; Kaijzel et al., 2007) и позволяют проводить in vivo флуоресцентную визуализацию узла опухолевого течение всего срока эксперимента. Зелёные В флуоресцентные белки GFP и EGFP широко применялись в доклинических исследованиях для in vivo мониторинга роста солидных опухолей (Yamaoka et al., 2010; Castano et al., 2006; Hoffman, 2005) и метастазов (Hoffman, 2014; Hoffman, 2002; Yamamoto et al., 2011). Однако в дальнейшем предпочтение отдают опухолевым и метастатическим моделям, меченым красными и дальнекрасными флуоресцентными белками, более подходящими ЛЛЯ визуализации биотканей (Winnard et al., 2006; Yamaoka et al., 2010), (Kleshnin et al., 2015; Christensen et al., 2015).

Разнообразие флуоресцентных белков с различными спектральными характеристиками открывает возможности для двухцветного и многоцветного *in vivo* флуоресцентного имиджинга опухолей. (*Hoffman, 2014; Yang et al., 2004;*

Tran Cao et al., 2009), в частности, основанного на введении флуоресцентных опухолевых клеток трансгенным животным, чтобы наблюдать отношения опухоль-хозяин.

флуоресцентного Поскольку с использованием прижизненного имиджинга на уровне целого организма можно проводить достоверную количественную оценку скорости роста опухоли, данный метод даёт возможность длительного неинвазивного мониторинга ответа опухоли на терапию В режиме реального времени. Подобные исследования продемонстрированы для химиотерапии (Katz et al., 2003), ФДТ (Castano et al., 2006; Mallidi et al., 2015), таргетной терапии (Zdobnova et al., 2015; Kimura et al., 2010) и иммунотерапии (Leblond et al., 2010).

Разработка высокочувствительных флуоресцентных методов визуализации и флуоресцентных сенсоров открывает уникальные возможности для изучения различных функциональных процессов в опухолевых клетках in vivo на уровне целого организма. Сенсор может представлять собой флуоресцентный белок, генетически закодированный в раковой клетке, либо химический флуоресцентный краситель, который вводится экзогенно. Продемонстрирована возможность обнаружения опухолеспецифических протеаз (ферментов с общей способностью к гидролизу пептидных связей), играющих ключевую роль в опухолевой прогрессии, с использованием прижизненного флуоресцентного имиджинга, что имеет большое значение для улучшения диагностики рака (Drake et al., 2011; Shimizu et al., 2014; Schellenberger et al., 2003; Goryashchenko et al., 2015).

Кроме того, использование флуоресцентно меченных лигандов против опухолеспецифических рецепторов позволяет визуализировать *in vivo* флуоресценцию молекулярных процессов в опухолевых моделях (*Fukumura et al., 1998; Ardeshirpour et al., 2012; Cai et al., 2006; Rudkouskaya et al., 2017*).

Также разработаны генетически-кодируемые флуоресцентные сенсоры на основе GFP-подобных белков для регистрации внутриклеточного pH, одного из ключевых показателей, который может служить в качестве индикатора

изменений клеточного метаболизма, клеточной пролиферации и уклонения от апоптоза, генетической нестабильности и множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток (*Matlashov et al., 2015; Shirmanova et al., 2015; Shirmanova et al., 2017*).

Изменение метаболического статуса раковых клеток в сторону более гликолитического является одним из ключевых индикаторов опухолевой прогрессии. Исследование метаболизма опухолевых клеток может быть выполнено путем измерения флуоресценции от эндогенных метаболических никотинамидадениндинуклеотида кофакторов. (HAДФ) И флавинадениндинуклеотида (ФАД). Как правило, *in vivo* флуоресцентный имиджинг метаболического статуса опухолевых клеток реализуются на клеточном уровне с помощью двухфотонной флуоресцентной микроскопии (Skala et al., 2007; Shah et al., 2015; Shirmanova et al., 2017). Недавние исследования показали возможность макроскопической прижизненной флуоресцентной визуализации опухолевого метаболизма с использованием инновационной конфокальной макросканирующей системы для флуоресцентного времяразрешенного имиджинга (Shcheslavskiy et al., 2018).

1.2. *In vivo* флуоресцентный имиджинг в исследовании новых противоопухолевых агентов

1.2.1. In vivo флуоресцентный имиджинг в исследовании новых фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии

ФДТ представляет собой перспективный метод лечения рака, при котором фототоксичные препараты - фотосенсибилизаторы – избирательно накапливаются в опухолевых клетках и под действием света в присутствии кислорода разрушают их в результате генерации АФК (*Mroz et al., 2011*). Фотосенсибилизаторы под воздействием видимого либо ближнего инфракрасного излучения способны переходить в возбуждённое триплетное состояние и реагировать с другими молекулами двумя различными путями. Фотосенсибилизаторы I типа в триплетном состоянии реагируют с молекулами

субстрата с образованием промежуточных свободных радикалов, которые, в свою очередь, взаимодействуют с кислородом с образованием АФК, таких как анион-радикал $(O_2-),$ пероксид супероксидный водорода (H_2O_2) И гидроксильный радикал (OH°) (DeRosa et., 2002). Фотосенсибилизаторы, относящиеся ко II типу, непосредственно взаимодействует с молекулярным триплетным кислородом $({}^{3}O_{2})$ с генерацией синглетного кислорода $({}^{1}O_{2})$ (Mehraban et al., 2015). Большинство фотосенсибилизаторов, используемых в клинической практике, относятся ко II типу (DeRosa et., 2002; Mehraban et al., 2015). Именно реакция фотосенсибилизации II типа считаются основным и наиболее эффективным механизмом ФДТ, так как синглетный кислород отличается значительно большей реакционной способностью по сравнению с другими АФК, образующимися в ходе фотохимической реакции I типа.



Рис. 3. І и ІІ типы фотохимических реакций с участием молекулы фотосенсибилизатора и кислорода с образованием АФК при облучении светом.

Большинство фотосенсибилизаторов для ФДТ опухолей представляют собой флуоресцентные молекулы, что дает возможность исследовать их с помощью флуоресцентного имиджинга на уровне целого организма. С одной in vivo флуоресцентный стороны, имиджинг позволяет оценить избирательность накопления новых фотосенсибилизаторов в опухоли, характер их распределения в организме в динамике, а также время максимального накопления в опухоли и наибольшего контраста по сравнению с нормальными тканями для проведения ФДТ. С другой стороны, с помощью *in vivo* флуоресцентного имиджинга можно оценить фотовыгорание фотосенсибилизаторов в ходе ФДТ, позволяющее предсказать потенциальную эффективность новых агентов и подобрать оптимальные параметры облучения опухолей.

Первые исследования *динамики накопления* фотосенсибилизаторов в опухоли у экспериментальных животных с использованием флуоресцентной визуализации относятся к концу 1990-х годов (*Major et al., 1996; Harada et al., 1998; Cubeddu et al., 1997; Ozturk et al., 2014; Mo et al., 2012). In vivo* флуоресцентный имиджинг даёт возможность анализировать избирательность накопления комплексов в опухоли путём оценки соотношения интенсивности сигнала в нормальных тканях. Также возможно оценить кинетику накопления комплексов в опухоли путём оценки интенсивности в различные временные точки и скорость выведения препарата из нормальных тканей путем оценки интенсивности флуоресценции агента в организме.

На сегодняшний день с использованием флуоресцентного имиджинга на уровне целого организма исследованы как новые агенты для ФДТ, так и модифицированные формы классических фотосенсибилизаторов. Недавно разработанные инновационные препараты включают в себя аналоги бактериохлорина (*Patel et al., 2016*), феофорбид а (*Ahn et al., 2017*), комплекс цианопорфиразина иттербия (*Klapshina et al., 2010; Shirmanova et al., 2011*), а также связанный с бутадиеном конъюгированный димер порфирина (*Khurana et al., 2011*).

al., 2012). Модифицированные формы классических фотосенсибилизаторов, исследованные с помощью флуоресцентной визуализации, включают модифицированные фталоцианины (*Li et al. 2015*), комплексы хлорина е6 с амфифильными полимерами (*Shirmanova et al., 2014; Gavrina et al., 2018*) и ряд многофункциональных препаратов, состоящих из фотосенсибилизатора и контрастного агента для MPT (*Wolfbeis et al., 2015; Bechet et al., 2012*).

Пример *in vivo* флуоресцентного имиджинга распределения флуоресцентного сигнала фотосенсибилизатора в организме животного с опухолью представлен на Рис. 4.



Рис. 4. *In vivo* флуоресцентные изображения мыши nude с HT-29 с опухолью после внутривенного введения свободного хлорина е6 и хлорин-е6-HSA наночастиц (5mg/kg). Адаптировано из *Jeong et al.*, 2011.

Перспективной стратегией в области диагностики и терапии рака стало создание *многофункциональных агентов*, сочетающих в себе возможности визуализации опухоли различными методами с терапевтическими свойствами. Активно проводятся исследования новых фототоксических агентов С возможностью мультимодальной визуализации (Liao et al., 2012). В частности, большой интерес представляет комбинация магниторезонансной томографии (MPT) флуоресцентного имиджинга. Данный подход И был успешно продемонстрирован в последних клинических исследованиях (Kaibori et al., 2016) (Eljamel et al., 2013; Gessler et al., 2015). МРТ позволяет провести дооперационную диагностику крупных очагов опухоли, а флуоресцентный имиджинг – обнаружение небольших опухолевых узлов и оценку степени опухолевой инвазии непосредственно во время операции, что позволяет провести полное и безопасное удаление опухолевых очагов (Kaibori et al., 2016; Eljamel et al., 2013; Inoue et al., 2015). Однако в данных исследованиях для МРТ и флуоресцентного имиджинга используются два отдельных контрастных агента, что может вызвать ряд осложнений – с одной стороны, увеличивается лекарственная нагрузка на организм, а с другой, не всегда возможно провести прямое адекватное сравнение результатов, полученных двумя различными методами. Следовательно, развитие данного подхода требует разработки единого агента для мультимодального имиджинга, позволяющего в полной использовать потенциальные преимущества методов гибридной мере визуализации (Louie et al., 2010; Lim et al., 2015).

Подавляющее большинство контрастирующих препаратов для МРТ, используемых в клинической диагностике, синтезированы на основе гадолиния (*Luo et al., 2014; Bottrill et al., 2006; Kumar et al., 2015*).

На сегодняшний день в нескольких предклинических исследованиях *in vivo* продемонстрированы бимодальные агенты на основе гадолиния для МРТ и оптического имиджинга в ближнем инфракрасном диапазоне, где в роли флуоресцентного агента выступали органические красители (*Nam et al., 2010; Harrison et al., 2015; Fei-Peng et al., 2016*). Показано, что подобный подход позволяет достичь высокой чувствительности (флуоресцентный имиджинг) и превосходного пространственного разрешения (МРТ) изображений опухолевой ткани (*Nam et al., 2010; Fei-Peng et al., 2016*), а кроме того даёт возможность следить за биораспределением (флуоресцентный имиджинг) и выведением препарата из организма (MPT) (*Harrison et al., 2015*).

Фототоксические агенты с контрастными магниторезонансными и флуоресцентными свойствами представлены в ряде *in vivo* исследований,

посвящённых ФДТ опухолевых моделей с одновременной возможностью бимодальной визуализации. Однако большинство гибридных агентов имеют сложную структуру, которая обычно включает магнитное ядро, фотосенсибилизатор, полимерное покрытие, оптический компонент и, в дополнение, таргетные молекулы (*Revia et al., 2016; Li et al., 2014*), и их синтез весьма трудоёмок, затрачивает много времени и средств. Следовательно, развитие данной тенденции с применением многофункциональных агентов требует оптимизации структуры препарата и процесса синтеза.

В Институте металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН были разработаны два инновационных агента *GdPz1 и GdPz2* на основе катиона гадолиния (III) для возможности МРТ в соединении с красными флуоресцентными тетрапиррольными макроциклами – порфиразинами Pz1 и Pz2.

Другим параметром исследовании важным В новых фотосенсибилизаторов ИХ фотовыгорание. Известно, является ЧТО флуоресцентный сигнал фотосенсибилизатора В опухоли снижается непосредственно после облучения, что свидетельствует о фотовыгорании флуорофора и, соответственно, о протекании реакции фотосенсибилизации. Многим химическим фотосенсибилизаторам присущи сложные механизмы фотовыгорания в тканях, которые зависят от многих факторов, таких как концентрация фотосенсибилизатора, концентрация кислорода и световая доза (Huang et al., 2012; Vollet-Filho et al., 2009). Преимущественно выгорание связано с атакой молекул фотосенсибилизатора АФК (главным образом, кислородом ¹O₂), что сопровождается их фотохимической синглетным деструкцией и необратимой потерей флуоресценции (Jarvi et al., 2012; Dysart et al., 2005; Sheng et al., 2007; Anbil et al., 2012). С одной стороны, фотовыгорание снижает концентрацию фотоактивного фотосенсибилизатора в ходе облучения, но, с другой стороны, значительное выгорание указывает на интенсивную продукцию АФК и, следовательно, высокую эффективность фотодинамической реакции.

Дозиметрия на основе оценки фотовыгорания фотосенсибилизатора, которое детектируется путём измерения сигнала флуоресценции с помощью *in* vivo флуоресцентного имиджинга, представляет собой чрезвычайно удобный, простой и недорогой подход для контроля параметров облучения и оценки эффективности ΦДТ. Для многих фотосенсибилизаторов проводили исследования взаимосвязи между фотовыгоранием фотосенсибилизатора и ответом на ФДТ, и некоторые работы демонстрируют корреляцию между ними. Так, в работе Vollet-Filho et al продемонстрирована взаимосвязь между выгоранием Фотогема в ходе ФДТ и глубиной некроза в печени крыс *in vivo* (Vollet-Filho et al., 2009). Кроме того, была обнаружена корреляция между интенсивностью флуоресценции Фотофрина in vivo в опухолевой модели с ответом на терапию (Wilson et al., 1997). В работе Sheng et al было показана кинетикой взаимосвязь между выгорания Протопорфирина IX, индуцированного введением 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛА), И возникновением отека вследствие ФДТ (Sheng et al., 2007). Кроме того, было установлено, что фотовыгорание Протопорфирина IX напрямую зависело от кислорода И не происходило, когда кислорода уровня становилось недостаточно. В исследовании Mallidi et al. была показана возможность предсказания клинического фототоксического ответа (эритемы) в результате 5-АЛА ΦДТ использованием с помощью дозиметрии с на основе фотовыгорания (Mallidi et al., 2015). Ascencio et al. же показал, что in vivo оценка фотовыгорания Протопорфирина IX может использоваться для прогнозирования реакции опухоли на ФДТ с гексаминолевулинатом (Ascencio et al., 2008).

Пример снижения интенсивности флуоресценции фотосенсибилизатора в ходе ФДТ вследствие фотовыгорания представлен на Рис. 5.



Рис. 5. Фотография (а) и *in vivo* флуоресцентные изображения опухоли на ухе до (b) и (c) непосредственно после ФДТ (c) у мыши после внутривеного введения фотосенсибилизатора Фотодитазина. Опухоль показана белой окружностью. Адаптировано из *Sirotkina et al.*, 2017.

Однако фотовыгорание не всегда даёт возможность предсказать эффективность ФДТ. Так, в работе Sirotkina et al. с использованием *in vivo* флуоресцентного имиджинга показана слабая корреляция между фотовыгоранием Фотодитазина и торможением роста опухолей (*Sirotkina et al., 2017*). В работе же Rezzoug et al. на опухолевой модели у мышей показано, что фотодинамическая активность Фоксана зависела от плотности мощности облучения, в то время как его фотовыгорание оставалось неизменным (*Rezzoug et al., 1998*).

Тем не менее, измерение фотовыгорания фотосенсибилизатора с помощью *in vivo* флуоресцентного имиджинга оказалось полезным в доклинических исследованиях, поскольку оно указывает, по крайней мере, на то, что произошла фотодинамическая реакция. Это помогает оценить фотодинамические свойства новых агентов и выбрать оптимальную световую дозу, необходимую для достижения максимального терапевтического эффекта.

Известно, что химические фотосенсибилизаторы обладают рядом недостатков, таких как относительно медленное накопление в опухолевой ткани, гетерогенное распределение в опухоли, неспецифическое накопление в

коже и слизистых и, как следствие, кожная фоточувствительность. Появление фототоксичных флуоресцентных белков нового класса способствовало генетически-кодируемого развитию принципиально новой концепции фотосенсибилизатора с заданной внутриклеточной локализацией. На сегодняшний день описано белков. обладающих всего несколько фототоксичными свойствами.

В 2006 г. в ИБХ РАН группой академика С.А. Лукьянова был создан флуоресцентный фототоксичный белок первый В мире KillerRed, представляющий собой GFP-подобный красный флуоресцентный белок, генерирующий АФК при облучении желтым светом (Рис. 6) (Bulina et al., 2006). Максимум его возбуждения находится на длине волны 585 нм, максимум эмиссии – на 610 нм. Квантовый выход флуоресценции KillerRed составляет 0.25. Структурной основой его фототоксичности является заполненный молекулами воды канал, который идет от торцевого конца β-бочонка и достигает области хромофора, а также пора в боковой стенке в-бочонка и наличие аминокислотных остатков Glu68 и Ser119 рядом с хромофором (*Pletnev* et al., 2009; Carpentier et al., 2009). Работает по первому механизму фотодинамической реакции.



Рис. 6. Структура красного флуоресцентного фототоксичного белка KillerRed (*Bulina et al., 2006; Pletnev et al., 2009; Carpentier et al., 2009*).

Способность KillerRed подавлять митоз и инициировать гибель клеток была под воздействием излучения широко продемонстрирована В исследованиях in vitro на культурах бактериальных и опухолевых клеток (Bulina et al., 2006, Serebrovskaya et al., 2011, Waldeck et al., 2011). Более того, патоморфологические эффекты ФДТ с KillerRed в качестве первого генетически-кодируемого фотосенсибилизатора были продемонстрированы in vivo в опухолях HeLa у иммунодефицитных мышей. Установлено, что облучение опухолей, экспрессирующих KillerRed, приводит к снижению флуоресцентного сигнала и значительному разрушению интенсивности опухолевых клеток. Однако, чтобы добиться такого эффекта, использовался достаточно интенсивный режим облучения (150 мВт/см², 270 Дж/см², раз в сутки в течение 7-ми дней). Следовательно, дальнейшие in vivo исследования KillerRed в роли генетически-кодируемого фотосенсибилизатора для ФДТ опухолей требуют оптимизации режима облучения. Так, в работе Kuznetsova et al. in vitro опухолевых сфероидах продемонтрирована бо́льшая на эффективность импульсного лазерного излучения по сравнению С непрерывным излучением при активации апоптоза (Kuznetsova et al., 2015).

В 2015 году путём мутагенеза белка KillerRed был создан оранжевый флуоресцентный фототоксичный белок KillerOrange, несущий хромофор на основе триптофана, что является новым для фотосенсибилизаторов (*Sarkisyan et al., 2015; Pletneva et al., 2015*).

В 2011 году в работе Shu et al. был впервые описан зелёный флавопротеин miniSOG (mini Singlet Oxygen Generator), продуцирующий синглетный кислород при облучении голубым светом. MiniSOG представляет собой белок фототропин 2, связывающийся с флавин-мононуклеотидом (ФМН), выступающим в роли хромофора, участвующего в переносе электрона на молекулярный кислород с генерацией синглетного кислорода (*Shu et al., 2011*). Изначально miniSOG был разработан как генетически-кодируемый высококонтрастный агент для электронной микроскопии. Позже miniSOG был успешно применён для индукции апоптоза и повреждений ДНК в опухолевых

клетках in vitro (Ryumina et al., 2013), хромофор-ассоциированной световой инактивации белков (Wojtovich et al., 2016), а также для фотоиндуцированной абляции клеток в исследованиях на культурах тканей (Shu et al., 2011) и червях Caenorhabditis elegans (Qi et al., 2012; Xu et al., 2016). Наконец, miniSOG был терапевтическом использован В новом подходе В качестве иммунофотосенсибилизатора для прицельного уничтожения опухолевых клеток in vitro (Mironova et al., 2016; Souslova et al., 2016). Однако подходы к in vivo применению белка miniSOG в качестве фотосенсибилизатора на сегодня не развиты. Предварительные исследования по ФДТ опухолей HeLa (рак шейки матки человека), экспрессирующих белок miniSOG, у мышей при непрерывном лазерного облучения не продемонстрировали терапевтического режиме эффекта, несмотря на высокую фототоксичность в экспериментах на клеточной культуре (*Ryumina et al., 2013*).

1.2.2. Флуоресцентные белки в качестве опухолевых антигенов

Флуоресцентные белки семейства GFP широко используются В биомедицинских исследованиях В качестве генетически-кодируемых флуоресцентных маркеров опухолевых клеток для неинвазивного мониторинга роста опухоли у животных и оценки терапевтического эффекта в ходе эксперимента (Chudakov et al., 2010; Hoffman et al., 2005). GFP-подобные белки охватывают весь видимый спектр от синего до дальне-красного и представляют собой мощный инструмент для визуализации живых структур клеток (*Hoffman* et al., 2015). Раковые клетки могут быть легко трансфецированы in vitro геном, белок, кодирующим флуоресцентный с использованием современных трансгенных технологий. После трансплантации модифицированных опухолевых экспериментальным животным, опухоли стабильно клеток экспрессируют флуоресцентный белок в течение неопределенного периода времени, и появляется возможность визуализировать их с помощью in vivo флуоресцентного имиджинга. Основным преимуществом опухолевых моделей, экспрессирующих флуоресцентные белки, является то, что они не требуют

введения дополнительного контрастного areнта (*Hoffman et al., 2002; Kaijzel et al., 2007*).

Впервые белок GFP был использован для *in vivo* флуоресцентной визуализации опухоли у мышей на уровне целого организма в 2000 году в работе Yang et al. (*Yang et al., 2000*). Была разработана стабильная GFP-экспрессирующая модель мышиной меланомы и колоректального рака человека, и продемонстрирована возможность флуоресцентной визуализации первичных опухолей и метастатических очагов параллельно с оценкой скорости роста опухолей в реальном времени. Впоследствии зелёные флуоресцентные белки GFP и EGFP широко применялись в доклинических исследованиях для *in vivo* мониторинга солидных опухолей (*Yamaoka et al., 2010; Castano et al., 2006; Hoffman et al., 2005*) и метастазов (*Hoffman et al., 2002; Yamamoto et al., 2011*)

На сегодняшний день существует широкий ряд GFP-подобных белков, спектр флуоресценции которых в целом покрывает весь видимый диапазон. Тем не менее, для работы с биотканями наиболее предпочтительны белки с флуоресценцией в области ближнего и дальнего ИК, поскольку тканевая автофлуоресценция и поглощение света в этих диапазонах ниже, чем в синезеленой области, и красный свет может проникать глубже в ткани (*Chudakov et* al., 2010; Luker et al., 2015). Глубина, с которой возможно детектировать сигнал флуоресценции, является важным фактором при визуализации опухоли. Благодаря дальнекрасные белки широко ЭТОМУ используются ДЛЯ неинвазивного флуоресцентного имиджинга глубоко расположенных опухолей у животных. На Рис. 7. Представлены примеры мониторинга роста опухоли и метастазов с помощью in vivo флуоресцентного имиджинга на уровне целого организма.



Рис. 7. (А) *In vivo* флуоресцентный имиджинг на уровне целого организма модели U87-GFP глиомы человека в головном мозге мыши nude спустя 1, 2 и 5 недель после хирургической ортотропической трансплантации. Адаптировано из *Hoffman et al.*, 2006.

(Б) *In vivo* флуоресцентный имиджинг первичного опухолевого очага и метастазов Mia-PaCa-2 рака поджелудочной железы человека, экспрессирующего красный флуоресцентный белок RFP, у мыши nude. Адаптировано из *Katz et al., 2003*.

глубоко Продемонстрирована возможность in vivo визуализации залегающих опухолей И метастазов, экспрессирующих красные флуоресцентные белки tdTomato, iRFP, KillerRed и Turbo FP650 (Winnard et al., 2006; Lai et al., 2016; Kleshnin et al., 2015; Meleshina et al., 2015). Кроме того, Bouvet et al. и Christensen et al. показали, что интенсивность флуоресценции опухолей, экспрессирующих красный флуоресцентный белок RFP либо Е2-Crimson соответственно, в значительной степени коррелирует с объемом и весом опухоли (Bouvet et al., 2005; Christensen et al., 2015). Также первичные опухолевые узлы И метастазы были визуализированы с высокой

чувствительностью с помощью *in vivo* флуоресцентного имиджинга на уровне целого организма благодаря экспрессии красных флуоресцентных белков RFP, Katushka и mCherry (*Yu et al., 2009; Nunez-Cruz et al., 2010; Yamaoka et al., 2010*).

In vivo исследования опухолевой прогрессии С использованием флуоресцентных белков чаще всего проводят на моделях рака человека у иммунодефицитных мышей. Однако известно, что зелёные флуоресцентные белки GFP И EGFP обладают иммуногенными свойствами, когда экспрессируются y иммунокомпетентных животных. Данное качество позволяет использовать их в качестве дополнительных опухолевых антигенов.

Иммуногенность опухоли – это её способность индуцировать иммунный ответ организма, который может предотвращать её развитие, в конечном итоге приводя к подавлению её роста либо к полной регрессии. С понятием иммуногенности тесно связано понятие антигенности – потенциальной способности молекулы антигена распознаваться иммунной системой путём связывания с Т- и В-клеточными рецепторами. Опухолевые антигены можно подразделить на опухолеспецифические, присутствующие исключительно на трансформированных клетках и отсутствующие на нормальных клетках, и опухолеассоциированные, которые ассоциированы с опухолевыми клетками, но могут присутствовать в небольших количествах и на нормальных клетках. Иммуногенность конкретной опухоли, с одной стороны зависит OT представленности опухолевых антигенов, а с другой, от способностей данной опухоли уклоняться от иммунологического надзора (Blankenstein et al., 2012; Барышников, 2003; Escors, 2014; Тюряева, 2008).

Существует широкий ряд механизмов, позволяющих опухоли ускользать из-под надзора иммунной системы (*Töpfer et al., 2011*). Во-первых, эффекторные Т-лимфоциты могут терять способность распознавать опухолевые клетки из-за слабой экспрессии, презентации или мутации опухолевых антигенов (*Gajewski et al., 2013*). Во-вторых, опухолевые клетки способны секретировать различные иммуносупрессорные факторы и цитокины,

подавляющие иммунный ответ организма: трансформирующий фактор роста β (TGF- β), интерлейкин-10 (IL-10), фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), интерферон гамма (IFN- γ), и некоторые другие (*Zamarron et al., 2011*). Втретьих, опухолевые клетки более устойчивы к апоптозу вследствие избыточной экспрессии анти-апоптотических молекул или подавления и мутации про-апоптотических факторов (*Hassan et al., 2014*). Кроме того, в опухолевом микроокружении происходит аккумуляция клеток, обладающих имуносупрессорным действием, таких, как регуляторные T-лимфоциты (*Zou et al., 2006*) и миелоидзависимые супрессорные клетки (MDSCs) (*Katoh et al., 2015*). Наконец, в опухолевом микроокружении происходит аккумуляция происходит продукция иммуносупрессорных метаболитов, таких как триптофан, аденозин, L-аргинин или лактат (*Platten et al., 2006*).

Иммуногенность опухолей, как новообразований у пациентов, так и экспериментальных опухолевых моделей у животных, широко варьирует для различных типов рака (*Fridman et al., 2012; Escors, 2014*). Иммуногенность опухолей зависит от многих факторов. Наличие опухолеспецифических антигенов, которые могут стать мишенью для иммунотерапии, считается хорошим прогнозом, однако встречаются они редко. Чаще мишенью для лечения становятся более слабые опухолеассоциированные антигены. На представленность антигенов влияет природа происхождения опухолей – индуцированных физическими, химическими факторами или вирусом либо спонтанно возникших. Наличие того или иного механизма ускользания из-под иммунологического надзора является индивидуальной особенностью опухолей (*Blankenstein et al., 2012; Барышников, 2003; Escors, 2014; Tюряева, 2008*).

Иммунотерапия рака ставит своей целью преодоление супрессии иммунологического надзора, распознавание опухолевых клеток иммунной системой организма, и, как следствие, подавление развития опухоли (*Zhou et al., 2014; Raval et al., 2014; Hedocnacos u dp., 2007; Яшин и dp., 2014*). В отличие от классических методов лечения злокачественных новообразований иммунотерапия направлена на восстановление способности иммунной системы организма бороться с заболеванием, а не только на непосредственное удаление опухоли.

Иммунотерапия рака подразделяется на активную И пассивную, специфическую неспецифическую. Пассивная И иммунотерапия не способствует формированию иммунологической памяти и основана пассивном введении в организм опухолеспецифичных моноклональных антител (Scott et al., 2012) или активированных иммунных клеток (адаптивная клеточная терапия) (Li et al., 2013). Активная же иммунотерапия нацелена на активацию внутреннего иммунного ответа и обеспечивает формирование долговременной противоопухолевой активности. Она включает себя применение В специфических антигенных препаратов – вакцин (Schlom et al., 2012), и неспецифических использование препаратов — цитокинов, некоторых бактериальных продуктов, синтетических молекул и гормонов (Lee et al., 2011).

Одним из перспективных агентов для иммунотерапии опухолей может выступать *лиганд рецептора OX40 – OX40L*, представляющий собой цитокин семейства факторов некроза опухоли (TNFSF4 от англ. Tumor necrosis factor ligand superfamily member 4; OX40 ligand) (Puc. 8). OX40L является мембранносвязанным белком, экпрессирующимся на активированных антигенпрезентирующих клетках, в частности, на дендритных клетках и, в меньшей степени, на В-лимфоцитах и макрофагах. Рецептор OX40 появляется на активированных Т-лимфоцитах после связывания Т-клеточного рецептора, и кроме того, экспрессируется на натуральных киллерах и нейтрофилах (*Aspeslagh et al., 2016; Webb et al., 2016*).

При связывании с агонистом рецептора на поверхности эффекторных Тклеток происходит костимуляция CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, продукция ими цитокинов, в основном, Т-хелперами 1 и 2, формирование CD4+ и CD8+ клеток памяти, пролиферация клеток, предотвращение их индуцированного апоптоза и индукции FoxP3+ рецептора наивными CD4+ клетками. В ряде работ показано, что регрессия опухолей в ходе OX40/OX40L иммунотерапии достигается благодаря работе эффекторных Т-лимфоцитов (*Kjaergaard, et al., 2000;*

Weinberg, et al., 2011). В работах Redmond et al., Ruby et al. и Salek-Ardakan et al. установлено, что при взаимодействии OX40L с антиген-специфическими CD8+ Т-лимфоцитами происходит увеличение количества CD8+ Т-лимфоцитов и генерация большего числа долгоживущих клеток памяти, а также увеличивается экспрессия белка гранзима и усиливается цитолитическая функция CD8+ Т-лимфоцитов через интерлейкин-2-зависимый механизм (*Redmond et al., 2007; Ruby et al., 2007; Salek-Ardakani et al., 2007; Jensen et al., 2010*).

Кроме того, рецептор ОХ40 экспрессируется на поверхности всех регуляторных Т-лимфоцитов у мышей и регуляторных FoxP3+ Т-лимфоцитов, выделенных из участков воспаления (например, опухолей), у человека. В ряде исследований продемонстрировано, что связывание агониста с рецептором на поверхности регуляторных Т-лимфоцитов приводит к подавлению супрессорной функции регуляторных Т-лимфоцитов и индукции их гибели. Однако в других исследованиях, напротив, обнаружено увеличение количества регуляторных Т-клеток, и предполагается, что анти-ОХ40 терапия может воздействовать на регуляторные Т-клетки, как увеличивая, так и снижая их число, в зависимости от условий (*Ruby et al., 2009; Xiao et al., 2012*).



Рис. 8. Действие лиганда рецептора ОХ40 на эффекторные CD4+ и CD8+ и регуляторные FoxP3+ Т-лимфоциты (*Aspeslagh et al., 2016; Webb et al., 2016; Weinberg, et al., 2011*).
В настоящее время активно проводятся доклинические исследования ОХ40/ОХ40L иммунотерапии, а также клинические испытания I/II фазы. Можно выделить несколько основных стратегий ОХ40/ОХ40L иммунотерапии: введение в организм агонистов рецептора ОХ40 (ОХ40L) – anti-ОХ40 моноклональных антител (ОХ86) и ОХ40L, слитого с Fc-фрагментом иммуноглобулина, а также трансфекция опухолевых или дендритных клеток геном ОХ40L (*Reuter et al., 2015; Dannull et al., 2005*).

In vivo исследования на широком ряде опухолевых моделей, включая колоректальный рак СТ26, меланому B16, глиому GL261, фибросакому MCA 20, лейкемию BM185, показали, что использование агонистов рецептора OX40 усиливает противоопухолевый иммунитет, приводит к полной либо частичной регрессии опухолей, улучшает выживаемость экспериментальных животных и способствует формированию иммунологической памяти, которая проявляется в устойчивости к повторной прививке опухоли (*Linch et al., 2015; Aspeslagh et al., 2016; Jensen et al., 2010*).

Трансфекция опухолевых клеток геном OX40L приводила к подавлению роста *in vivo* экспериментальных опухолевых моделей колоректального рака CT26, меланомы B16, глиобластомы GL261 и лимфомы EL4 (*Andarini et al., 2004; Kaneko et al., 2005; Shibahara et al., 2015; Gri et al., 2003*).

Перспективным направлением является комбинирование анти-OX40 терапии с другими видами иммунотерапии, в частности, с применением цитокинов, вакцин, ингибиторов контрольных точек и адоптивной клеточной терапией, что позволит преодолеть супрессию микроокружения опухоли (Linch et al., 2015).

В настоящее время существует несколько различных молекул – агонистов рецептора ОХ40, использующихся в клинических испытаниях с участием пациентов с метастазирующим раком: 9B12, IgG1, (anti-OX40); MEDI0562 (anti-OX40); MEDI6469 (anti-OX40); MEDI6383 (OX40L-Fc); MOXR0916 (anti-OX40); PF-04518600 (*Aspeslagh et al., 2016*).

37

Клинические испытания I фазы монотерапии (NCT01644968) с использованием 9В12, мышиного моноклонального антитела против ОХ40, несмотря на сильную биоактивность соединения, не продемонстрировали выраженного противоопухолевого ответа, однако испытания I/II фазы комбинированной иммунотерапии с антителами anti-PD1/PDL1 показали значительный иммуностимулирующий эффект с регрессией по крайней мере одного метастатического очага у 30% пациентов (меланома, рак почки, уретральный рак, рак предстательной железы и холангиокарцинома) (*Curti et al.,2013*). Ислледуются и другие комбинации anti-OX40 терапии с антителами против CTLA-4 и CD20, а также с химиотерапией с циклофосфаном и радиотерапией (*Aspeslagh et al., 2016*).

Разработка новых способов иммунотерапии рака требует создания высокоиммуногенных опухолевых моделей. Некоторые экспериментальные опухолевые модели, такие как лимфомы RMA и EL-4, мастоцитома P815 и меланома E6B2, являются высокоиммуногенными (*Hu et al., 1994; Chen et al., 1994*). Однако большинство экспериментальных опухолей обладают слабой иммуногенностью. Известно, что клеточная линия колоректального рака мышей CT26 слабоиммуногенна. Впервые в работе Fearon et al. не удалось продемонстрировать какой бы то ни было устойчивости к повторной привитым CT26 опухолям у мышей линии Balb/c, у которых ранее была удалена исходно привитая CT26 опухоль (*Fearon et al., 1988*).

Повысить иммуногенность в экспериментальных условиях можно путём введения дополнительного антигена, в роли которых могут выступать вирусные белки, в частности гемагглютинин гриппа, и некоторые другие белки (β-галактозидаза 24, мышиный B7-1/CD80 белок 25) (*Wada et al., 2009; Hu et al., 2007; Chen et al., 1994*)

Особый интерес представляют флуоресцентные генетически-кодируемые белки. Они дают уникальную возможность, с одной стороны, повысить иммуногенность опухолевой модели и, с другой стороны, проводить прижизненный мониторинг опухолевого роста и регрессии с помощью *in vivo*

флуоресцентного имиджинга (Stripecke et al., 1999; Castano et al., 2006). Иммуногенные свойства зелёных флуоресцентных белков GFP и EGFP были продемонстрированы на различных опухолевых моделях, включая лейкемию BM185 (*Stripecke et al., 1994; Lustgarten et al., 2004*), EL-4 мышиную Tклеточную и B-клеточную лимфомы (*Donnou et al., 2011*), карциному молочной железы 4T1 (*Bosiljcic et al., 2011*), фибросаркому RIF-1 (Castano *et al., 2004*), саркому CMS4 (Gambotto *et al., 2000*), λ -hu-MYC-лимфому (Gerbitz *et al., 2012*), колоректальную аденокарциному CT26 (Steinbauer *et al., 2003*).

Установлено, что способ введения опухолевых клеток оказывает существенное влияние на развитие иммунологического ответа против флуоресцентного белка (Ansari, *et al., 2016*). В работе Skelton et al. показано, внутривенное введение иммунокомпетентным мышам линии Balb/c опухолевых клеток BM185 приводило к развитию рака и, в конечном итоге, к гибели животных. В то же время введение опухолевых клеток, трансфецированных белком EGFP, не приводило к развитию лейкоза. Следует отметить, что введение опухолевых клеток BM185 иммунодефицитным мышам вызывало развитие заболевание и смерть вне зависимости от трансфекции клеток EGFP, что подтверждает роль иммунной системы в регрессии рака. При подкожном же введении опухолевых клеток независимо от опухолевой линии различий в выживаемости иммунокомпетентных животных не отмечалось (*Skelton et al., 2001*).

Развитие иммунного ответа и подавление формирования метастазов при внутривенном введении опухолевых клеток, экспрессирующих GFP или EGFP, было отмечено также в работах Steinbauer et al. и Bosiljcic, et al. (*Steinbauer et al., 2003; Bosiljcic, et al. 2011*).

При подкожном введении опухолевых клеток иммуногенные свойства EGFP проявляются ярче у повторно привитых опухолей. В исследовании Castano et al. у всех животных после хирургического удаления опухоли RIF-1-EGFP при повторной прививке опухоли RIF-1-EGFP новообразования росли гораздо медленнее (*Castano et al., 2006*).

Кроме того, линия экспериментальных животных также может влиять на проявление иммунного ответа. Так, обнаружено, что белок EGFP более иммуногенен у мышей линии Balb/c, нежели у мышей линии C57BL/6 (*Skelton*, 2001).

Между тем, красные и дальнекрасные флуоресцентные белки более предпочтительны для *in vivo* визуализации живых структур, так как в этом случае меньше поглощение света тканями и автофлуоресценция. Однако иммуногенные свойства их пока не изучены.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Клеточные линии

Клеточные линии колоректального рака мышей СТ26 (ATCC CRL-2638), стабильно экспрессирующего KillerRed (СТ26-КR), EGFP (СТ26-EGFP) либо коэекспрессирующего EGFP и цитокин OX40Lexo (СТ26-EGFP-OX40L) были созданы в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН) (Москва, Россия).

Для культивирования клеток использовали среду DMEM, содержащую глутамин (1%), 10% телячьей сыворотки, пенициллин-стрептомицин (50 мкг/мл). Культивирование осуществляли во флаконах (25 см²) в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37°C и 85% влажности. Снятие клеток осуществляли при помощи раствора трипсин-ЭДТА (25%) в течение 10 минут. Субкультивирование проводили два–три раза в неделю по достижении монослоем конфлюентности 70%.

Опухолевые модели

Эксперименты проводились на 328 иммунокомпетентных мышах линии Balb/c весом 18-20 г, приобретенных в Научном центре биомедицинских технологий "Андреевка" (Москва, Россия). Животных содержали в условиях вивария с 12-часовым световым ритмом.

Эксперименты проводились на мышах линии Balb/с 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 *b* длина опухолевого узла. Коэффициент торможения роста опухолей на определённый день после терапии рассчитывали по формуле: TPO = $(1 - ((V_T - V_{T0})/V_{T0})/((V_K - V_{K0})/V_{K0})))*100\%$, 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 ТРО=0% – нет торможения роста опухолей; 0-100% – опухоли растут медленнее, чем в контроле; >100% – опухоли уменьшаются в размере.

Все эксперименты, выполняемые на животных, проводились согласно протоколам работы Этического Комитета Приволжского исследовательского медицинского университета (Нижний Новгород, Россия).

2.2. Методы

In vivo флуоресцентный имиджинг

Флуоресцентный имиджинг животных с опухолью проводили с помощью установки для флуоресцентного молекулярного имиджинга IVIS-Spectrum (Caliper Life Sciences, США) (режим регистрации эпилюминесценции). Флуоресценцию порфиразиновых комплексов гадолиния возбуждали на длине волны 605/30 нм, регистрировали на 660/20 нм. Флуоресценцию KillerRed возбуждали на 570/30 нм, регистрировали на 620/20 нм; флуоресценцию EGFP возбуждали на 465/30 нм, регистрировали на 520/20 нм. Кроме того, при оценке фотовыгорания KillerRed в опухоли получали in vivo флуоресцентные изображения с помощью установки для эпилюминесцентного имиджинга (ИПФ РАН, Россия). При этом флуоресценцию KillerRed возбуждали на 585 нм, регистрировали на 685/80 нм. На время процедуры получения *in vivo* флуоресцентных изображений животных наркотизировали 2.5% изофлураном. В ходе мониторинга роста опухолей, экспрессирующих EGFP либо KillerRed, in vivo флуоресцентные изображения 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/см²/стерадиан)(мкмВт/см²).

Исследование биораспределения новых порфиразиновых комплексов гадолиния

Два новых металлорганических комплекса на основе катиона гадолиния (III) флуоресцентными В соединении с красными тетрапиррольными (порфиразинами) GdPz1 (тетра-4-фтормакроциклами фенилтетрацианопорфиразиновый GdPz2 комплекс гадолиния) И (тетрафенилтетрацианопорфиразиновый комплекс гадолиния). были синтезированы в лаборатории кремнийорганических соединений Института металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН (Нижний Новгород, Россия) (Рис. 9). В металлокомплексе GdPz1 в периферийное обрамление порфиразинового макроцикла введены *пара*-фторфенильные заместители, а в GdPz2 – арильные фрагменты.



Рис. 9. Структура порфиразиновых металлокомплексов GdPz1 и GdPz2 на основе катиона гадолиния (III) с красными флуоресцентными тетрапиррольными макроциклами.

Для оценки накопления новых комплексов в опухоли и нормальных тканях мышам с опухолью CT26 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: $(U\Phi_{onyxonb} - U\Phi_{hopma})/(U\Phi_{onyxonb} + U\Phi_{hopma})$, где $U\Phi_{onyxonb}$ – интенсивность флуоресценции в зоне опухоли, а $U\Phi_{hopma}$ – интенсивность флуоресценции в зоне опухоли, а 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: $(U\Phi_{\partial o} - U\Phi_{nocne})/U\Phi_{\partial o}*100\%$, где $U\Phi_{\partial o}$ – усреднённая интенсивность флуоресценции по площади опухоли до облучения, а $U\Phi_{nocne}$ – интенсивность флуоресценции в опухоли непосредственно после облучения. Также оценивали скорость роста опухолей после ФДТ.

Оценка in vivo экспрессии в опухоли и противоопухолевой активности OX40Lexo

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-OX40L первично и вторично привитых опухолей, выживаемость мышей методом Каплана-Мейера, а также спонтанную метастатическую активность в мышей. Подсчёт количества лёгочных различных группах метастазов проводили макроскопически, результаты верифицировались с помощью *ex vivo* флуоресцентного имиджинга лёгких непосредственно после извлечения. 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 2x10⁷ клеток. Спустя три дня мышам-реципиентам подкожно вводили 2×10^5 CT26-EGFP опухолевых клеток и проводили оценку прививаемости опухолей.

Исследование иммуногенности красного флуоресцентного белка KillerRed

В ходе работы оценивали прививаемость и скорость роста СТ26 и СТ26-КR опухолей, а также интегральную интенсивность флуоресценции по площади СТ26-КR опухоли. Кроме того, анализировали прививаемость и рост повторно привитых опухолей, для чего у мышей с СТ26 либо с СТ26-КR опухолью на 9-й день роста опухоли хирургически удалялись, и спустя 21 день животным в противоположное бедро прививались СТ26 или СТ26-КR опухоли в той же дозе. Оценивали усреднённую интенсивность флуоресценции повторно и исходно привитых СТ26-КR опухолей. Для индукции метастазов в лёгких интактным мышам и мышам с ранее удалённой СТ26-КR опухолью внутривенно в хвостовую вену вводили смесь по 5х10⁴ СТ26 и СТ26-КR клеток (1:1). Подсчёт количества лёгочных метастазов проводили макроскопически, результаты верифицировались с помощью *ex vivo* флуоресцентного имиджинга

45

лёгких непосредственно после извлечения. В ходе проведения иммуномодулирующей терапии опухоли СТ26-КR 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.

Кроме того, для исходно привитых опухолей, экспрессирующих KillerRed либо EGFP, рассчитывали отношение сигнала флуоресценции в опухоли к сигналу автофлуоресценции окружающих нормальных тканей по формуле $U\Phi_{onyxonb}/U\Phi_{hopma}$, где $U\Phi_{onyxonb}$ – усредненная интенсивность флуоресценции по площади опухоли, а $U\Phi_{hopma}$ – усредненная интенсивность автофлуоресценции по зоне нормальных тканей на противоположном бедре животного.

ФДТ KillerRed-экспрессирующих опухолей

Для облучения опухолей, экспрессирующих KillerRed использовали непрерывный лазер MGL-III-593 (CNI, Китай) (593 нм) и 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/см² либо с помощью импульсного лазера при 225 мВт/см² в течение интервала времени от 5 до 30 Температуру поверхности кожи опухолевого узла МИН. измеряли С использованием 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: ($H\Phi_0 - H\Phi_N$)/ $H\Phi_0*100\%$, где $H\Phi_0 - H\Phi_0$ 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 белком KillerRed опухоли облучали раз в день в течение трёх дней, начиная с 6-го дня роста опухоли, 30 мин при 150 мВт/см² и 270 Дж/см² в непрерывном режиме либо 25 мин при 225 мВт/см² и 337 Дж/см² в импульсном режиме. Спустя 24 ч после последнего сеанса облучения проводили патоморфологический анализ опухолевых узлов. Кроме того оценивали скорость роста опухолей 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, критерия Бонферрони либо точного теста Фишера, где необходимо. $P \le 0.05$ считалось статистически значимым. Все данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

3.1.1 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 путём оценки соотношения интенсивности сигнала флуоресценции в опухоли к интенсивности сигнала в нормальных тканях, а также анализировали кинетику накопления комплексов в опухоли путём оценки интенсивности флуоресцентного сигнала в опухоли в динамике.

Мониторинг накопления порфиразиновых комплексов гадолиния GdPz1 и GdPz2 в опухоли и в нормальных тканях проводился после внутривенного введения комплекса в дозе 12 мг/кг (0.01 ммоль/кг) мышам Balb/c с СТ26 опухолью. На Рис. 10А, 1Б представлены *in vivo* флуоресцентные изображения животных до (контроль) и после введения комплекса. Спустя 6 часов после GdPz1 GdPz2 инъекции или 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. 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.



Рис. 10. *In vivo* флуоресцентные изображения мыши до и в различных временных точках после введения GdPz1 (A) либо GdPz2 (Б). (В) Количественный анализ усреднённой интенсивности флуоресценции в опухоли и зоне нормальных тканей после введения GdPz1 или GdPz2 (из значений вычитали базовые значения автофлуоресценции тканей до введения препарата). Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (n=7). *Статистически значимые отличия между группами «Опухоль, GdPz1» и «Нормальные ткани, GdPz1», *P*≤0.03; #между группами «Опухоль, GdPz2» и «Нормальные ткани, GdPz2», Р≤0.02. (U-критерий Манна-Уитни) (Г) Зависимость контраста опухоль/нормальные ткани от времени после введения GdPz1 либо GdPz2. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (n=7).

В результате избирательного накопления комплексов в опухоли сигнал 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. 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 $6.6\pm 0.8 \times 10^8$ $4.3\pm0.7 \times 10^8$ соответственно, И составила. $(\phi o t o h/ce k/cm^2/ct e paguah)(m km Bt/cm^2).$ В GdPz2 случае же 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 введения составила, соответственно, 8.3±0.4x10⁸ и 5.4±0.4x10⁸ $(\phi o t o h/c e k/c m^2/c t e p a g u a h)(m k m B t/c m^2).$

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.

50

3.1.2. Детальный анализ биораспределения новых порфиразиновых комплексов гадолиния в опухоли и нормальных тканях животного методом ех vivo флуоресцентного 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. 11).

Обнаружено, что интенсивность флуоресцентного сигнала в опухолевых узлах, накопивших GdPz1 либо GdPz2, была статистически значимо выше $(6.5\pm1.1 \times 10^8$ и $8.9\pm1.6 \times 10^8$ (фотон/сек/см²/стерадиан)(мкмВт/см²) соответственно), нежели в окружающих нормальных тканях — коже $(3.1\pm1.2 \times 10^8$ и $2.8\pm0.6 \times 10^8$ соответственно) и мышцах $(1.4\pm0.4 \times 10^8$ и $2.5\pm0.4 \times 10^8$ 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.



Рис. 11. *Ex vivo* флуоресцентные изображения опухоли и внутренних органов мыши после введения GdPz1 (A) либо GdPz2 (Б) спустя 3 ч после инъекции. (В) Количественный анализ усреднённой интенсивности флуоресценции по площади опухолевого узла и внутренних органов (из значений вычитали базовые значения автофлуоресценции опухолевых узлов и органов у мышей без введения комплекса). Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (n=3). *Статистически значимое отличие между группами «Опухоль, GdPz1» и «Кожа, GdPz1», P=0.0372; # между группами «Опухоль, GdPz2» и «Кожа, GdPz2», P=0.0102; ** между группами «Опухоль, GdPz1» и «Мышца, GdPz1», P=0.00963; ##между группами «Опухоль, GdPz2» и «Мышца, GdPz2», *P*=0.0126 (U-критерий Манна-Уитни).

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

3.1.3. 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.

Известно, что флуоресцентный сигнал фотосенсибилизатора в опухоли непосредственно облучения, снижается после что свидетельствует 0 флуорофора. Данное фотовыгорании явление сопровождает реакцию фотосенсибилизации, и с его помощью можно анализировать потенциальную эффективность ФДТ (Jarvi et al., 2012; Dysart et al., 2005).

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. 12Б, 3В).



Рис. 12. Фотовыгорание GdPz1 либо GdPz2 в опухоли. *In vivo* флуоресцентные изображения CT26 опухоли после введения GdPz1 (А) или GdPz2 (Б) до и непосредственно после облучения. Опухоль показана белой окружностью. Количественный анализ

усреднённой интенсивности флуоресценции по площади опухоли после введения комплекса GdPz1 (B, Д) либо GdPz2 (Г, Е) до и после облучения (из значений вычитали базовые значения автофлуоресценции в опухоли до введения препарата). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=7). *Статистически значимое отличие между группами «GdPz2, До облучения» и «GdPz2, После облучения», *P*=0.034.

Кроме того, ФДТ СТ26 опухолей с GdPz1 не оказывала влияния на рост опухолей, тогда как ФДТ 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. 13).

B GdPz2 металлокомплексе В периферийное обрамление порфиразинового макроцикла введены арильные фрагменты, отличающиеся по структуре пара-фторфенильных своей ОТ заместителей. обрамляющих порфиразиновый макроцикл в GdPz1. Терапевтический эффект ФДТ с GdPz1 предположительно обусловлен наличием п-донорного атома кислорода в арильных фрагментах, обрамляющих макроцикл, что имело своей целью попытку тонкой настройки взаимодействия потенциального препарата с биологическими молекулами клеточных компартментов.



Рис. 13. Влияние ФДТ с GdPz1 либо GdPz2 на рост СТ26 опухолей у Balb/с мышей. ФДТ проводили на 10 день после инъекции опухолевых клеток (показано стрелкой). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=7). *Статистически значимые отличия между группами «Контроль (без облучения)» и «ФДТ с GdPz2», *P*≤0.027 (U-критерий Манна-Уитни).

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

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

В настоящей работе OX40Lexo, 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 OX40L и осуществлять

55

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 OX40Lexo 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 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. 14). 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. 14В).



Рис. 14. Динамика роста СТ26 (А), СТ26-EGFP (Б) и СТ26-EGFP-OX40Lexo (В) опухолей, подкожная инъекция 2x10⁵ опухолевых клеток мышам Balb/c (n=10). Прививаемость указана на графиках в скобках.

Репрезентативные *in vivo* флуоресцентные изображения регрессирующей опухоли CT26-EGFP-OX40Lexo, а также развивающейся опухоли CT26-EGFP, полученные в процессе мониторинга опухолевого роста, представлены на Рис. 15. Наличие флуоресцентного сигнала от EGFP в опухолевом узле подтверждает экспрессию OX40Lexo опухолевыми клетками.



Рис. 15. *In vivo* флуоресцентные изображения мыши с развивающейся CT26-EGFP (A) и регрессирующей CT26-EGFP-OX40Lexo (Б) опухолью. Жёлтой окружностью показана опухоль. 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 0.96) (Рис. 16). Вследствие этого, данные о внешних размерах опухоли могут быть верифицированы с помощью результатов *in vivo* флуоресцентного имиджинга.



Рис. 16. Корреляция интегральной интенсивности флуоресцентного сигнала по площади опухоли и объема опухоли, рассчитанного на основе внешних размеров опухолевого узла (R² – коэффициент корреляции Пирсона).

Процесс регрессии опухолей наиболее наглядно можно видеть на кривых Каплана-Мейера, где отображается процент мышей без опухоли (животные с неразвившейся либо регрессировавшей опухолью) от общего числа животных в экспериментальной группе (Рис. 17).



Рис. 17. Кривые Каплана-Мейера для мышей с СТ26, СТ26-EGFP или СТ26-EGFP-ОХ40Lexo опухолью (подкожная инъекция 2x10⁵ опухолевых клеток). n=10.

В ходе работы проводился анализ формирования спонтанных метастазов в лёгких у мышей с первичной СТ26, СТ26-EGFP либо СТ26-EGFP-OX40Lexo опухолью. Лёгкие извлекали после выведения животного из эксперимента по достижении опухоли объёма 1500 мм³.

Таблица 1. Наличие спонтанных метастазов в лёгких у мышей с СТ26, СТ26-EGFP либо СТ26-EGFP-ОХ40Lexo опухолью (подкожная инъекция 2х10⁵ опухолевых клеток).

	CT26	CT26-EGFP	CT26- EGFP-OX40Lexo
Количество	30%	10%	0%
животных с	(3 из10)	(1 из 10)	(0 из 10)
метастазами			



Рис. 18. *Ex vivo* флуоресцентные изображения и фотографии лёгких мышей с первично привитой опухолью CT26-EGFP (A) или CT26-EGFP-OX40Lexo (Б). Спонтанные метастазы в лёгких показаны стрелками.

Установлено, что ни у одной из 10-ти мышей с первично привитой опухолью CT26-EGFP-OX40Lexo не развивались метастазы в лёгких, тогда как у животных с CT26 либо CT26-EGFP опухолью формировались метастазы в лёгких (Таблица 1, Рис. 18).

Обнаружено, 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 2).

Таблица 2. Повторная прививаемость CT26-EGFP опухолей (подкожная инъекция 5х10⁵ клеток) у мышей с ранее привитой опухолью.

Исходная инт	Повторная прививаемость	
CT26-EGFP,	мыши со сформировавшейся опухолью	3 (3), 100%
2x10 ⁵ клеток	мыши с регрессировавшей опухолью	1 (5), 20%
CT26-EGFP-OX40Lexo,	мыши со сформировавшейся опухолью	1 (1), 100%
2x10 ⁵ клеток	мыши с регрессировавшей опухолью	0 (2), 0%
CT26-EGFP-OX40Lexo,	мыши со сформировавшейся опухолью	3 (4), 75%
5х10 [°] клеток	мыши с регрессировавшей опухолью	0 (4), 0%

Кроме того, в качестве дополнительного доказательства формирования иммунологической памяти проводился адоптивный перенос иммунитета с помощью клеток селезёнки (Таблица 3). Обнаружено, что все мыши (20 из 20), получившие внутрибрюшинную инъекцию от доноров с регрессировавшей СТ26-EGFP-OX40Lexo опухолью, демонстрировали устойчивость к развитию СТ26-EGFP опухолей. В то же время прививаемость СТ26-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 СТ26 или СТ26-EGFP опухолью.

Таблица 3. Прививаемость CT26-EGFP опухолей у мышей после адоптивного переноса иммунитета.

Доноры клеток селезёнки	Прививаемость СТ26-EGFP опухоли (подкожная инъекция 2x10 ⁵ 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 СТ26-EGFP-OX40Lexo опухолью	0 (20), 0%*	

*Статистически значимые отличия между группой «Мыши с регрессировавшей СТ26-EGFP-OX40Lexo опухолью» и остальными группами, *P*=0.0462 (точный тест Фишера).

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

3.3 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 медленный рост, больший разброс в размерах опухолевых узлов на поздних этапах развития опухолей (Рис. 19) и более (85 против 100%) сравнению низкую прививаемость ПО С немодифицированными СТ26 опухолями (Таблица 4).



Рис. 19. Динамика роста исходно привитых СТ26 и СТ26-КR опухолей у мышей Balb/c (подкожная инъекция 1×10^6 клеток). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n = 7). *Статистически значимое отличие между СТ26 и СТ26-КR опухолями, *P*=0.0451 (U-критерий Манна-Уитни).

	CT26	CT26-KR
Исходная прививаемость при инъекции 1х10 ⁶ клеток	13(13), 100%	22(26), 85%
Исходная прививаемость при инъекции 5х10 ⁵ клеток	21(21), 100%	22(25), 88%
Повторная прививаемость при инъекции 5х10 ⁵ клеток	7(9), 78%	3(7), 43%*

Таблица 4. Прививаемость СТ26 и СТ26-КR опухолей.

мышам с ранее удалённой СТ26-КК опухолью		
Повторная прививаемость при инъекции 5x10 ⁵ клеток	7(9) 97 50/	9(10) 900/
мышам с ранее удалённой СТ26 опухолью	7(0), 87.3%	8(10), 80%

*Статистически значимые отличия между группами «Исходная прививаемость при инъекции 5х10⁵ CT26-KR клеток» и «Повторная прививаемость при инъекции 5х10⁵ CT26-KR клеток мышам с ранее удалённой CT26-KR опухолью». *P*=0.0239 (точный тест Фишера).

Репрезентативные *in vivo* флуоресцентные изображения CT26-KR опухоли представлены на Рис. 20. Наличие флуоресцентного сигнала от KillerRed в опухолевом узле подтверждает экспрессию белка опухолевыми клетками в течение всего срока наблюдения.





Рис. 20. *In vivo* флуоресцентные изображения мыши с СТ26-КК опухолью (инъекция 1х10⁶ клеток). Жёлтой окружностью показана опухоль. 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. 21). Вследствие этого, данные о внешних размерах опухоли могут быть верифицированы с помощью результатов *in vivo* флуоресцентного имиджинга.



Рис. 21. Корреляция интегральной интенсивности флуоресцентного сигнала по площади опухоли и объема опухоли, рассчитанного на основе внешних размеров опухолевого узла (R² – коэффициент корреляции Пирсона).

Обнаружено, что мыши с хирургически удалённой CT26-KR опухолью (подкожная инъекция 5×10^5 опухолевых клеток) демонстрируют ингибирование роста повторно привитых CT26-KR опухолей (43% мышей) (Рис. 22) либо полную устойчивость к формированию опухолей (57% мышей) (Таблица 4). Исходная же прививаемость CT26-KR опухолей при такой же дозе клеток составляет 88% (22 из 25 мышей). Для сравнения, подкожная инъекция 5х10⁵ немодифицированных СТ26 опухолевых клеток мышам с ранее удалённой СТ26-КR опухолью не приводит к снижению прививаемости – прививаемость в таком случае составляет 78% (7 из 9 мышей). Также повторная инъекция СТ26 либо CT26-KR опухолевых удалённой клеток мышам с ранее немодифицированной СТ26 опухолью приводит к формированию опухолей у 87.5% либо 80% мышей соответственно. Другими словами, формирование устойчивости к развитию опухолей происходит только в случае, когда животным, ранее имевшим опухоль, экспрессирующую белок KillerRed, повторно прививают опухоль, также экспрессирующую KillerRed.

64



Рис. 22. Динамика роста исходно и повторно привитых CT26-KR опухолей у мышей Balb/c (подкожная инъекция 5×10^5 клеток). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n = 7). *Статистически значимое отличие между CT26 и CT26-KR опухолями, *P*=0.0451(U-критерий Манна-Уитни).

In vivo флуоресцентные изображения и замеры опухолевых узлов проводили на 5-й, 7-й, 11-й, 15-й, 18-й и 22-й дни роста опухолей (Рис. 23А, 15Б). На Рис. 13В представлены зависимости интенсивности флуоресценции исходно либо повторно привитых CT26-KR опухолей от среднего объема опухолей в группе. Обнаружено, что интенсивность флуоресценции повторно привитых CT26-KR опухолей была намного ниже, чем у исходно привитых СТ26-КК опухолей соответствующего объема на поздней стадии роста. Предположительно, данное явление связано с уменьшением числа KillerRedэкспрессирующих клеток В повторно привитых опухолях вследствие уничтожения их иммунной системой.



Рис. 23. *In vivo* флуоресцентные изображения мыши с исходно (А) либо повторно (Б) привитой СТ26-КR опухолью. Жёлтой окружностью показана опухоль. Срок после подкожной инъекции опухолевых клеток указан под изображениями. (В) Зависимость усредненной интенсивности флуоресценции опухолей от объема опухолей. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. *Статистически значимые отличия между группами «Исходно привитые СТ26-КR опухоли, средний объём опухолей 776.3±299.8 мм³» и «Повторно привитые СТ26-КR опухоли 836.2±248.8 мм³», *P*=0.00113.

Анализ формирования индуцированных СТ26-КК метастазов в лёгких проводился у мышей с ранее удалённой СТ26-КК опухолью, а также у интактных мышей, после внутривенного введения им смеси СТ26 и СТ26-КК опухолевых клеток (1:1). В ходе работы осуществлялась попытка *in vivo* флуоресцентной визуализации Killer-Red экспрессирующих метастазов в лёгких у мышей. На Рис. 24 представлены *in vivo* флуоресцентные изображения

мыши после внутривенного введения опухолевых клеток и контрольной мыши без введения опухолевых клеток.



Рис. 24. *In vivo* флуоресцентный имиджинг мыши линии Balb/с спустя 21 день после внутривенного введения смеси CT26 и CT26-KR клеток (А) 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 автофлуоресценции нормальных тканей в области лёгких у контрольных животных без введения опухолевых клеток.

С использованием *ex vivo* флуоресцентного имиджинга установлено, что после внутривенной инъекции смеси CT26 и CT26-KR клеток у интактных мышей в лёгких формируются метастазы, содержащие оба типа клеток. В то же время в лёгких мышей с ранее удалённой CT26-KR опухолью не было зарегистрировано флуоресценции от KillerRed, и формировались метастазы,

содержащие только немодифицированные СТ26 клетки. При этом количество метастазов было значительно меньше (Рис. 25).



Рис. 25. Метастазы в лёгких после внутривенной инъекции смеси 5х10⁴ СТ26 и 5х10⁴ СТ26 и 5х10⁴ СТ26-КR клеток интактным мышам (А) и мышам с ранее удалённой СТ26-КR опухолью (Б). *Ех vivo* флуоресцентные изображения и фотографии лёгких. Число метастазов указано на фото.

Известно, что терапия с использованием малых доз противоопухолевых 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 иммуногенной опухолевой модели CT26-KR была апробирована терапия с использованием малой дозы циклофосфана. Как и ожидалось, терапия с использованием циклофосфана приводила К ингибированию роста CT26-KR 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. 26).



В ходе работы проводился *in vivo* флуоресцентный имиджинг групп животных с лечением терапевтической или малой дозой циклофосфана либо без лечения (контроль) (Рис. 27А, 19Б, 19В). На Рис. 27Г представлены зависимости усреднённой интенсивности флуоресценции СТ26-КR опухолей от среднего объема опухолей в группе на определённые дни роста.



Рис. 27. *In vivo* флуоресцентные изображения мыши с опухолью из группы «Контроль (без лечения)» (А), «Терапевтическая доза циклофосфана» (Б) либо «Малая доза циклофосфана» (В). Жёлтой окружностью показана опухоль. Срок после подкожной инъекции опухолевых клеток указан под изображениями. (Г) Зависимость усредненной интенсивности флуоресценции CT26-KR опухолей от среднего объема опухолей в ходе лечения циклофосфаном. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n=7). *Статистически значимая разница между группами «Малая доза циклофосфана, средний объем опухолей 461.4±96.2 мм³» и «Контроль (без лечения), средний объем опухолей 788.5±312.2 мм³ «; между группами «Малая доза циклофосфана, средний объем опухолей 461.4±96.2 мм³» и «Терапевтическая доза циклофосфана, средний объем опухолей 492.6±198.7 мм³», *P*≤0.001 (U-критерий Манна-Уитни).

Установлено, что при объёме опухолей свыше 400 мм³ средняя интенсивность флуоресценции опухолей в группе «Малая доза циклофосфана» существенно ниже интенсивности флуоресценции опухолей в группах «Контроль (без лечения)» «Терапевтическая доза циклофосфана» И соответствующего объема. Поскольку использование малой дозы циклофосфана иммуномодулирующее действие. имеет снижение интенсивности сигнала флуоресценции предположительно также 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. 28). 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. 28. Кривые выживаемости Каплана-Мейера (n=7). Животных выводили из

эксперимента по достижении опухоли объёма 1500 мм³.

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

Известно, что для визуализации биологических объектов более предпочтительны белки с флуоресценцией в красной области спектра, поскольку автофлуоресценция тканей и поглощение света в этом диапазоне ниже. В ходе работы оценивали соотношения опухоль/автофлуоресценция нормальных тканей в случае визуализации опухолей, экспрессирующих красный флуоресцентный белок KillerRed, и сравнивали его с соотношением в случае визуализации опухолей, экспрессирующих зелёный флуоресцентный EGFP. Ha Рис. 29 белок представлены зависимости интенсивности соотношения опухоль/автофлуоресценция флуоресценции И нормальных тканей от среднего объёма опухолей.


Рис. 29. Зависимость усреднённой интенсивности флуоресценции в зоне опухоли, экспрессирующей EGFP (возбуждение 465/30 нм, прием 520/20 нм) (А) либо KillerRed (возбуждение 570/30 нм, прием 620/20 нм) (Б) и автофлуоресценции в зоне нормальных тканей среднего объёма опухолей. **(B)** Зависимость соотношения от опухоль/автофлуоресценция нормальных тканей от среднего объёма опухолей. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n = 7 и 10 соответственно). *Статистически значимое отличие между группами «KillerRed, средний объем опухолей 115.7±51.2 мм³» и «EGFP, средний объем опухолей 138.2±64.5 мм³», *P*=0.0437 (U-критерий Манна-Уитни).

Несмотря на то, что интенсивность флуоресценции опухолей, экспрессирующих красный флуоресцентный белок KillerRed, ниже, чем опухолей, экспрессирующих зелёный белок EGFP, соответствующего размера, отношение сигнала опухоль/автофлуоресценция нормальных тканей выше в

случае визуализации животных с KillerRed-экспрессирующей опухолью. Данное явление связано с тем, что сигнал автофлуоресценции нормальных тканей при параметрах возбуждения и приема флуоресценции в случае KillerRed значительно ниже, чем в случае с зелёным белком EGFP.

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

Известно, что красный флуоресцентный белок KillerRed обладает выраженными фототоксическими свойствами, продемонстрированными на культурах раковых клеток и опухолевых моделях у иммунодефицитных качестве мышей, выступать генетически-кодируемого И может В фотосенсибилизатора ФДТ опухолей. Однако, чтобы добиться для выраженного терапевтического эффекта на опухолевой модели, использовался достаточно интенсивный режим облучения (150 мВт/см², 270 Дж/см², раз в сутки в течение 7-ми дней) (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 оценивали фотовыгорание KillerRed и изменение температуры на поверхности опухоли при облучении мощностью 110, 150, 260 или 320 мВт/см² для лазера с непрерывным излучением и 225 мВт/см² для лазера с импульсным излучением. Известно, что явление фотовыгорания белка KillerRed сопровождает реакцию фотосенсибилизации, и с его помощью можно анализировать потенциальную эффективность ФДТ. Другим фактором, сопровождающим ФДТ, является изменение температуры опухоли вследствие облучения. Для того чтобы избежать влияния температурных эффектов на результаты ФДТ с KillerRed, было важно подобрать такие параметры лечения, чтобы достичь максимального

выгорания фотосенсибилизатора в опухоли при минимальном повышении температуры.



Рис. 30. Фотовыгорание белка KillerRed в CT26-KR опухолях. *In vivo* флуоресцентные изображения CT26-KR опухолей при облучении непрерывным (А) либо импульсным (В) лазером. Над изображениями указано время облучения, слева указана плотность мощности излучения. Опухоль указана стрелкой. Количественная оценка снижения интенсивности флуоресценции белка в процессе облучения опухолей непрерывным (Б) либо импульсным (Г) лазером. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=7).

Установлено, облучение опухолей непрерывным лазером с плотностью мощности 260 либо 320 мВт/см² позволяет добиться снижения интенсивности флуоресценции KillerRed до 60% при увеличением времени облучения до 30

мин (Рис. 30). Однако из-за значительного повышения температуры на поверхности опухоли данные плотности мощности исключены из дальнейшего рассмотрения (Таблица 5). При 110 мВт/см² температурных эффектов обнаружено не было, однако степень выгорания белка довольно низкая (~25%), что, скорее всего, недостаточно для разрушения опухолевых клеток. Облучение же 150 мВт/см² 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/см², 25 мин) без повышения температуры на поверхности опухоли.

Таблица 5. Температура на поверхности CT26-KR опухоли после лазерного воздействия. Температура опухоли до облучения составляла 31.7 ± 1.3°C.

Режим	110 мВт/см ² ,	150 мВт/см ² ,	260 мВт/см ² ,	320 мВт/см ² ,	225 мВт/см ² ,
	непрерывный	непрерывный	непрерывный непрерывный		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

На основе данных о флуоресценции опухолей и температуре на поверхности опухолевых узлов после облучения, были отобраны два режима для ФДТ: 270 Дж/см² (150 мВт/см², 30 мин) для лазера с непрерывным излучением и 337 Дж/см² (225 мВт/см², 25 мин) для лазера с импульсным излучением.

Для проведения ФДТ опухоли облучали раз в день в течение 3-х дней, начиная с 6-го дня роста. Интенсивность флуоресценции опухолей измеряли до и непосредственно после каждого сеанса облучения (Рис. 21).



Рис. 31. Количественная оценка снижения интенсивности флуоресценции белка в ходе ФДТ до и после облучения опухолей непрерывным (А) либо импульсным (Б) лазером. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение, (n=7).

ФДТ опухолей, экспрессирующих KillerRed, в непрерывном режиме излучения не вызвала каких-либо дистрофических изменений в опухоли (Рис. 32). Опухолевая ткань в данном случае имела плотную структуру и состояла из полиморфных клеток различных размеров с большими ядрами круглой или овальной формы, содержащими диффузно распределенный хроматин и 1-2 ядрышка. Цитоплазма слабой базофильной окраски образовывала тонкое кольцо вокруг ядра. Структура CT26-KR опухолей, облученных в непрерывном режиме, в целом, идентична структуре необлучённых образцов, а также структуре CT26 опухолей, не содержащих белок KillerRed, подвергшихся или не подвергшихся облучению.



Рис. 32. Гистологические изображения (H&E) CT26 (А) и CT26-KR (Б) 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).

Облучение CT26-KR опухолей в импульсном режиме, напротив, приводило к выраженным дистрофическим изменениям в опухолевых клетках. Отклонения В структуре клеток включали вакуолизацию цитоплазмы, укрупнённые вследствие отёка либо неправильной формы гиперхромные ядра и конденсацию хроматина. Количественный анализ образцов показал, что процент дистрофически изменённых клеток увеличился с 17.6% в группе с необлученными CT26-KR опухолями до 62.8% после ФДТ CT26-KR опухолей в импульсном режиме (Таблица 6). Причём наибольший вклад в клеточные изменения вносят укрупнения ядер И вакуолизация цитоплазмы. Соответственно, доля неизмененных типичных клеток опухоли, подсчитанная отдельно, снизилась с 82.4% до 37.2%.

Кроме того, наблюдалось 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 «). Также, общее число клеток в поле зрения было меньше по сравнению с другими группами вследствие того, что клетки СТ26-КR опухолей после импульсного облучения были сильно увеличены в размерах, иногда вплоть до разрыва клеточной оболочки.

 Таблица
 6.
 Количественная
 оценка
 клеточных
 нарушений,

 индуцированных
 ФДТ с KillerRed в опухолях.

Клетки	CT26-KR			CT26		
	Непрерывны	Импульсн	Без	Непрерывны	Импульсный	Без
	й режим	ый режим	облучения	й режим	режим	облучения
Типичные опухолевые, %	79.9±2.4	37.2±2.2*	82.4±0.7	80.0±4.8 [#]	80.5±0.8	83.8±1.0
С признаками митоза, %	6.9±1.8	0.2±0.1*	8.5±1.6	7.1±2.2	10.1±0.3	9.3 ±1.4
Дистрофически измененные, %	20.1±2.4	62.8±2.2*	17.6±0.7	20.0±4.8 [#]	19.5±0.8	16.2±1.0
С гиперхромным	13.5±1.4	35.8±2.3*	10.6±2.6	11.5±3.1	12.6±0.9	10.9±1.3
и укрупнёнными ядрами, %						
С вакуолизацией цитоплазмы, %	12.9±3.4	30.8±1.0*	10.9±1.1	10.7±3.5	10.8±0.9	10.4±1.8
С конденсацией хроматина, %	2.0±0.8	7.0±0.6**	1.4±0.9	5.8±3.6 [#]	2.1±1.2	1.1±0.9
С признаками апоптоза, %	0.9±0.1	8.4±1.8*	0.2±0.1	0.9±0.3	0.2±0.1	0.3±0.1
Общее число клеток в поле зрения	145.5±11.4	125.1±10.9* *	137.6±13.2 [#]	137.9±12.6	144.2±8.6	147.9±10.1

Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Подсчёт клеток проводился в пяти произвольно выбранных полях зрения для каждой опухоли. Статистически значимые отличия между группами определялись в программе STATISTICA с помощью критерия Бонферрони (one-way ANOVA), где *P*≤0.05 считалось значимым.

*, $P \le 0.01$, по сравнению со всеми остальными группами.

**, $P \le 0.03$, по сравнению с группами «CT26-KR, непрерывный режим» и «CT26-KR, без облучения».

#, $P \le 0.01$, по сравнению с группой «СТ26, без облучения».

ФДТ с KillerRed в непрерывном режиме не имела заметного влияния на опухолевые клетки. Небольшое увеличение в количестве изменённых клеток (с 17.6% до 20.1%) сходно с состоянием в группе «СТ26, непрерывный режим» и может быть обусловлено термическими эффектами либо фотоактивацией эндогенных хромофоров.

Анализ динамики роста CT26-KR опухолей показал, что ФДТ опухолей в импульсном режиме способствует ингибированию роста опухолей у мышей (Рис. 33). Облучение CT26-KR опухолей непрерывным лазером, напротив, не оказывает никакого влияния на скорость роста опухолей. Наблюдалась статистически значимая разница в среднем размере соответствующих опухолевых узлов на 16-й день роста опухолей. Тем не менее, ни в одном из случаев не наблюдалось полного излечения животных.



Рис. 33. Влияние ФДТ на рост СТ26-КК опухолей у мышей линии Balb/c. ФДТ проводили на 6, 7 и 8-й дни после инъекции опухолевых клеток (показано стрелками). Опухоли облучали при 260 Дж/см² (150 мВт/см², 30 мин) в непрерывном режиме либо при 337 Дж/см² (225 мВт/см², 25 мин) в импульсном режиме. Данные представлены как

среднее значение \pm стандартное отклонение (n = 7). *Статистически значимое отличие по сравнению с контрольной группой «СТ26-КR, контроль (без облучения)», $P \le 0.01$.

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 иммунокомпетентных мышей с использованием импульсного излучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые проведено *in vivo* исследование новых агентов для иммунотерапии рака и фотосенсибилизаторов для ФДТ опухолей методом флуоресцентного имиджинга на уровне целого организма.

Проведено биораспределения исследование двух инновационных порфиразиновых комплексов гадолиния GdPz1 И GdPz2, обладающих флуоресцентными и магниторезонансными свойствами. На основании данных об интенсивности флуоресценции комплексов в опухоли и нормальных тканях показано, что GdPz1 и GdPz2 избирательно накапливаются в опухоли. Порфиразиновые комплексы гадолиния позволяют осуществлять оценку эффективности ФДТ на основании данных об их фотовыгорании в опухоли в ходе облучения торможении опухолей после ФДТ. И роста Продемонстрировано, что комплекс GdPz2, в периферийное обрамление порфиразинового макроцикла которого введены арильные фрагменты с пдонорным атомом кислорода, обладает выраженными фототоксическими свойствами и может быть использован в качестве фотосенсибилизатора для ФДТ опухолей. Использование нового порфиразинового металлокомплекса GdPz2 представляет собой перспективный подход для ФДТ опухолей с мониторинга терапии в реальном времени с помощью возможностью флуоресцентной визуализации в сочетании с точной диагностикой опухоли методом МРТ. Для повышения эффективности ФДТ с GdPz2 возможно модифицировать режим облучения, в частности проводить облучение опухоли спустя более короткое время после введения агента для нацеливания на сосудистую сеть опухоли.

Проведена прижизненной экспрессии опухоли оценка В И противоопухолевой активности нового иммуностимулирующего цитокина OX40Lexo, секретирующегося во внеклеточную среду, путём визуализации зелёного флуоресцентного белка EGFP, коэкспрессирующегося с OX40Lexo. В настоящей работе молекула OX40Lexo **Fc-**фрагментом не слита с

иммуноглобулина G1, как в остальных исследованиях, что даёт возможность изучить непосредственное влияние лиганда на опухолевые клетки без эффекта от иммуноглобулина. Наличие флуоресцентного сигнала от EGFP в опухоли подтверждает экспрессию OX40Lexo на протяжении всего эксперимента. Установлено, что экспрессия OX40Lexo приводит к регрессии опухолей и развитию иммунологической памяти. Таким образом, OX40Lexo представляет собой эффективный агент для иммунотерапии рака, и дальнейшее его использование требует развития способов доставки агента в опухоль.

С использованием in vivo флуоресцентного имиджинга иммуногенность красного флуоресцентного продемонстрирована белка KillerRed в опухоли у мышей, 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 CT26-KR опухолью и в снижении интенсивности флуоресценции повторно привитых опухолей CT26-KR. Также показано снижение интенсивности флуоресценции и торможение роста СТ26-KR иммуномодулирующей терапии применением опухолей после С циклофосфана. Высокоиммуногенная флуоресцирующая опухолевая модель, экспрессирующая красный флуоресцентный белок KillerRed может быть использована для изучения механизмов иммунного ответа организма против опухоли и для тестирования новых комбинированных терапевтических подходов в сочетании с возможностью прижизненного флуоресцентного имиджинга на уровне целого организма.

Изучены фототоксические свойства красного флуоресцентного белка KillerRed при воздействии непрерывного и импульсного лазерного излучения. С использованием *in vivo* флуоресцентного имиджинга установлено, что 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.

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 CT26-KR опухолью и в снижении интенсивности флуоресценции повторно привитых опухолей CT26-KR, а также показано снижение интенсивности флуоресценции и торможение роста CT26-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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барышников, А. Ю. Взаимоотношение опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. 2003. Т. 4(30). С.127-130.

2. Красников И. В., Привалов В. Е., Сетейкин А. Ю., Фотиади А. Э. Распространение оптического излучения в биологических тканях // Вестник СПбГУ. 2013. Т. 11(4). С.202-217.

3. Недоспасов С. А., Купраш Д. В. Онкоиммунология: некоторые фундаментальные проблемы иммунотерапии рака // Молекулярная биология. 2007. Том 41(2). С. 355-368.

4. Тучин В. В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2013. – 812 с.

Тюряева И. И. Опухолевые антигены // Цитология. 2008. Т. 50(3). С. 189-209.

6. Яшин К.С., Медяник И.А. Иммунотерапия злокачественных опухолей головного мозга (обзор) // СТМ. 2014. Т. 6(4). С. 189-200.

7. Anbil S, Rizvi I, Celli JP, Alagic N, Hasan T. A photobleaching-based PDT dose metric predicts PDT efficacy over certain BPD concentration ranges in a three-dimensional model of ovarian cancer // Proc. of SPIE. 2012. V. 8568. P. 85680S.

8. Andarini S, Kikuchi T, Nukiwa M. Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer of OX40 ligand to tumor cells enhances antitumor immunity of tumorbearing hosts // J Cancer Res. 2004. V. 64(9). P.3281-7.

9. Ansari, A. M., Ahmed, A. K., Matsangos, A. E., Lay, F., Born, L. J., Marti, G., Sun, Z. Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments // Stem Cell Reviews. 2016. V. 12(5). P. 553–559.

10. Ahn MY, Yoon HE, Moon SY, Kim YC, Yoon JH. Intratumoral photodynamic therapy with newly synthesized pheophorbide a in murine oral cancer // Oncol Res. 2017. V. 25(2). P. 295-304.

11. Ardeshirpour Y, Chernomordik V, Zielinski R, Capala J, Griffiths G, Vasalatiy O, Smirnov AV, Knutson JR, Lyakhov I, Achilefu S, Gandjbakhche A, Hassan M. *In Vivo* Fluorescence Lifetime Imaging Monitors Binding of Specific Probes to Cancer Biomarkers // PLoS ONE. 2012. V. 7(2). P. e31881.

12. Ascencio M, Collinet P, Farine MO, Mordon S. In vivo PpIX fluorescence photobleaching is useful to predict the tissue response to HAL-PDT // Lesers Surg. Med. 2008. V. 40(5). P. 332–341.

 Aspeslagh S, Postel-Vinay S, Rusakiewicz S, Soria JC, Zitvogel L, Marabelle A. Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy // Eur J Cancer. 2016.
 V. 52. V. 50-66.

14. Ballou B., Ernst L. A., Waggoner A. S. Fluorescence Imaging of Tumors In Vivo // Current Medicinal Chemistry. 2005. V. 12. P. 795-805 795.

15. Bechet D, Frochot C, Vanderesse R, Barberi-Heyob M. Innovations of Photodynamic Therapy for Brain Tumors: Potential of Multifunctional Nanoparticles // J Carcinogene Mutagene. 2012. S8:001.

16. Berezin, M. Y., Achilefu, S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging // Chemical Reviews. 2010. V. 110(5). P. 2641–2684.

17. Blankenstein, T., Coulie, P. G., Gilboa, E., & Jaffee, E. M. The determinants of tumour immunogenicity // Nature Reviews. Cancer. 2012. V. 12(4).P. 307–313.

18. Bosiljcic M, Hamilton MJ, Banath JP, Lepard NE, McDougal DC, Jia JX, Krystal G, Bennewith KL. Myeloid Suppressor Cells Regulate the Lung Environment—Letter. // Cancer Res. 2011. V. 71(14). P. 1–2.

19. Bottrill M, Kwok L, Long NJ. Lanthanides in magnetic resonance imaging // Chem Soc Rev. 2006. V. 35(6). P. 557-571.

20. Bouvet M, Spernyak J, Katz MH, Mazurchuk RV, Takimoto S, Bernacki R, Rustum YM, Moossa AR, Hoffman RM. High correlation of whole-body red fluorescent protein imaging and magnetic resonance imaging on an orthotopic model of pancreatic cancer // Cancer Res. 2005. V. 65(21). P. 9829-33.

Bulina ME, Chudakov DM, Britanova OV, Yanushevich YG, Staroverov DB, Chepurnykh TV. A genetically encoded photosensitizer // Nat. Biotech. 2006. V. 24(1). P. 95–99.

22. Cai W, Shin DW, Chen K, et al. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects // Nano Lett. 2006. V. 6. P. 669-676.

23. Carpentier P, Violot S, Blanchoin L, Bourgeois D. Structural basis for the phototoxicity of the fluorescent protein KillerRed // FEBS Lett. 2009. V. 583(17).P. 2839-42.

24. Castano AP, Liu Q, Hamblin MR. A green fluorescent proteinexpressing murine tumour but not its wild-type counterpart is cured by photodynamic therapy // British Journal of Cancer. 2006. V. 94(3). P. 391–397.

25. Castano AP, Mroz P, Wu MX, Hamblin MR. Photodynamic therapy plus low-dose cyclophosphamide generates antitumor immunity in a mouse model // PNAS. 2008. V. 105(14). P. 5495–5500.

26. CDeRosa M., JCrutchley R. Photosensitized singlet oxygen and its applications // Coordination Chemistry Reviews. 2002. V 233–234. P. 351-371

27. Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston JV, Hellström I, Hellström KE. B7-1/CD80-transduced tumor cells elicit better systemic immunity than wild-type tumor cells admixed with Corynebacterium parvum // Cancer Res. 1994. V. 54(20). P. 5420–5423.

28. Christensen J, Vonwil D, Shastri VP. Non-Invasive *In Vivo* Imaging and Quantification of Tumor Growth and Metastasis in Rats Using Cells Expressing Far-Red Fluorescence Protein // PLoS One. 2015. V. 10(7). P. e0132725.

29. Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA. Fluorescent proteins ad their applications in imaging living cells and tissues // Physiol Rev. 2010. V. 90(3). P. 1103-63.

30. Cubeddu R, Canti G, Pifferi A, Taroni P, Valentini G. Fluorescence lifetime imaging of experimental tumors in hematoporphyrin derivative-sensitized mice // Photochem Photobiol. 1997. V. 66(2). P. 229-36.

31. Dannull J, Nair S, Su Z, Boczkowski D, DeBeck C, Yang B, Gilboa E, Vieweg J. Enhancing the immunostimulatory function of dendritic cells by transfection with mRNA encoding OX40 ligand // Blood. 2005. V. 105(8). P. 3206-13.

32. Ding H., Wu F. Image Guided Biodistribution and Pharmacokinetic Studies of Theranostics // Theranostics. 2012. V. 2(11). P. 1040–1053.

33. Drake CR, Miller DC, Jones EF. Activatable Optical Probes for the Detection of Enzymes. Current organic synthesis. 2011. V. 8. P. 498–520.

34. Dysart J.S., Singh G., Patterson M.S. Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells // Photochem. Photobiol. 2005. V. 81. P. 196–205.

35. Donnou S, Galand C, Daussy C, Crozet L, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Fisson S. Immune adaptive microenvironment profiles in intracerebral and intrasplenic lymphomas share common characteristics // Clinical and Experimental Immunology. 2011. V. 165(3). P. 329–337.

36. Eljamel S, Petersen M, Valentine R, Buist R, Goodman C, Moseley H, Eljamel S. Comparison of intraoperative fluorescence and MRI image guided neuronavigation in malignant brain tumours, a prospective controlled study // Photodiagnosis Photodyn Ther. 2013. V. 10(4). P. 356-361.

37. Escors, D. Tumour immunogenicity, antigen presentation and immunological barriers in cancer immunotherapy // New Journal of Science. 2014. V. 2014. P. 734515

38. Ewelt C, Nemes A, Senner V, Wölfer J, Brokinkel B, Stummer W, Holling M. Fluorescence in neurosurgery: Its diagnostic and therapeutic use. Review of the literature // J Photochem Photobiol B. 2015. V. 148. P. 302-309.

39. Farrell, T.J., Hawkes, R.P., Wilson, B.C. Modeling of photosensitizer fluorescence emission and photobleaching for photodynamic therapy dosimetry // Appl. Opt. 1998. V. 37. P. 7168–7183.

40. Fearon E.R. Itaya T, Hunt B, Vogelstein B, Frost P. Induction in a murine tumor of immunogenic tumor variants by transfection with a foreign gene // Cancer Res. 1988. V. 48(11). P. 2975–2980.

41. Fei-Peng Z, Guo-Tao C, Shou-Ju W, Ying L, Yu-Xia T, Ying T, Jian-Dong W, Chun-Yan W, Xin W, Jing S, Zhao-Gang T, Guang-Ming L. Dual-Modality Imaging Probes with High Magnetic Relaxivity and Near-Infrared Fluorescence Based Highly Aminated Mesoporous Silica Nanoparticles // Journal of Nanomaterials. 2016. V. 2016. P.1-9. Article ID 6502127.

42. Fridman W. H., Pagès F, Sautès-Fridman C., Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome // Nat. Rev. Cancer. 2012. V. 12. P. 298–306.

43. Fukumura D. Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells // Cell. 1998. V. 94. P. 715-25.

44. Gajewski T.F., Schreiber H., Fu Y.-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment // Nat Immunol. 2013. V. 14. P. 1014–1022.

45. Gambotto A, Dworacki G, Cicinnati V, Kenniston T, Steitz J, Tüting T, Robbins PD, DeLeo AB. Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kdrestricted CTL epitope // Gene Ther. 2000. V. 7(23). P. 2036–2040.

46. Gessler F, Forster MT, Duetzmann S, Mittelbronn M, Hattingen E, Franz K, Seifert V, Senft C. Combination of Intraoperative Magnetic Resonance Imaging and Intraoperative Fluorescence to Enhance the Resection of Contrast Enhancing Gliomas // Neurosurgery. 2015. V. 77(1). P. 16-22.

47. Gerbitz A, Sukumar M, Helm F, Wilke A, Friese C, Fahrenwaldt C, Lehmann FM, Loddenkemper C, Kammertoens T, Mautner J, Schmitt CA, Blankenstein T, Bornkamm GW. Stromal interferon- γ signaling and cross-presentation are required to eliminate antigen-loss variants of B cell lymphomas in mice // PLoS One. 2012. V. 7(3). P. e34552.

48. Gri G, Gallo E. OX40 ligand-transduced tumor cell vaccine synergizes with GM-CSF and requires CD40-Apc signaling to boost the host T cell antitumor response // J Immunol. 2003. V. 170(1). P. 99-106.

49. Harada M, Aizawa K, Okunaka T, Kato H. In vivo fluorescence kinetics of mono-l-aspartyl chlorin e6 (NPe6) and influence of angiogenesis in fibrosarcomabearing mice // International Journal of Clinical Oncology. 1998. V. 3(4). P. 209-215.

50. Harrison VSR, Carney CE, MacRenaris KW, Waters EA, Meade TJ. Multimeric Near IR–MR Contrast Agent for Multimodal In Vivo Imaging // Journal of the American Chemical Society. 2015. V. 137(28). P. 9108-9116

51. Hassan M., Watari H., AbuAlmaaty A., Ohba Y., Sakuragi N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer // Biomed Res Int. 2014. V. 2014. P. 150845.

52. Hoffman RM. In vivo imaging of metastatic cancer with fluorescent proteins // Cell Death Differ. 2002. V. 9(8). P. 786-9.

53. Hoffman RM. The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo // Nature Reviews Cancer. 2005. V. 5(10), P. 796–806.

54. Hoffman RM, Yang M. Whole-body imaging with fluorescent proteins // Nat Protoc. 2006. V. 1(3). P. 1429-38.

55. Hoffman RM. Imaging metastatic cell trafficking at the cellular level in vivo with fluorescent proteins // Methods Mol Biol. 2014. V. 1070. P. 171-9.

56. Hoffman RM. Application of GFP imaging in cancer // Laboratory Investigation. 2015. V. 95(4). P. 432–452.

57. Huang K., Chen L., Lv S., Xiong J., J. Protoporphyrin IX photobleaching of subcellular distributed sites of leukemic HL60 cells based on ALA-PDT in vitro // Biomedical Science and Engineering. 2012. V. 5. P. 548 – 555.

58. Hu W, Davis JJ, Zhu H, Dong F, Guo W, Ang J, Peng H, Guo ZS, Bartlett DL, Swisher SG, Fang B. Redirecting adaptive immunity against foreign antigens to tumors for cancer therapy // Cancer Biol. Ther. 2007. V. 6(11). P. 1773–1779.

59. Inoue A, Ohnishi T, Kohno S, Nishida N, Nakamura Y, Ohtsuka Y, Matsumoto S, Ohue S. Usefulness of an Image Fusion Model Using Three-Dimensional CT and MRI with Indocyanine Green Fluorescence Endoscopy as a Multimodal Assistant System in Endoscopic Transsphenoidal Surgery // International Journal of Endocrinology. 2015. V. 2015. P. 1-10 Article ID 694273.

Jablonski A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes // Nature.
 1933. V. 131. P. 839–840.

61. Jarvi MT, Patterson MS, Wilson BC. Insights into photodynamic therapy dosimetry: simultaneous singlet oxygen luminescence and photosensitizer photobleaching measurements // Biophys J. 2012. V. 102(3). P. 661–671.

62. Jensen SM, Maston LD, Gough MJ, Ruby CE, Redmond WL, Crittenden M, Li Y, Puri S, Poehlein CH, Morris N, Kovacsovics-Bankowski M, Moudgil T, Twitty C, Walker EB, Hu HM, Urba WJ, Weinberg AD, Curti B, Fox BA. Signaling through OX40 enhances antitumor immunity // Semin Oncol. 2010. V. 37(5). P. 524-532.

63. Jeong H, Huh M, Lee SJ, Koo H, Kwon IC, Jeong SY, Kim K. Photosensitizer-Conjugated Human Serum Albumin Nanoparticles for Effective Photodynamic Therapy // Theranostics. 2011. V. 1. P. 230-239.

64. Jiang S, Gnanasammandhan MK, Zhang Y. Optical imaging-guided cancer therapy with fluorescent nanoparticles // J R Soc Interface. 2010. V. 7(42). P. 3–18.

65. Kaibori M, Matsui K, Ishizaki M, Iida H, Okumura T, Sakaguchi T, Inoue K, Ikeura T, Asano H, Kon M. Intraoperative Detection of Superficial Liver Tumors by Fluorescence Imaging Using Indocyanine Green and 5-aminolevulinic Acid // Anticancer Res. 2016. V. 36(4). P. 1841-1849.

66. Kaijzel EL, van der Pluijm G, Löwik CW. Whole-body optical imaging in animal models to assess cancer development and progression // Clin Cancer Res. 2007. V. 13(12). P. 3490-7.

67. Kaneko H, Hori T, Yanagita S, Kadowaki N, Uchiyama T. Introduction of OX40 ligand into lymphoma cells elicits anti-lymphoma immunity in vivo // Exp Hematol. 2005. V. 33. P. 336–43.

68. Kanno, S., Utsunomiya, K., Kono, Y., Tanigawa, N., Sawada, S. The effect of radiation exposure on multidrug resistance: in vitro and in vivo studies using non-small lung cancer cells // EJNMMI Research. 2015. V. 5. P. 11.

69. Katoh H., Watanabe M. Myeloid-Derived Suppressor Cells and Therapeutic Strategies in Cancer // Mediators of Inflammation. 2015. V. 2015. P. 159269.

70. Katz MH, Takimoto S, Spivack D, Moossa AR, Hoffman RM, Bouvet M. A novel red fluorescent protein orthotopic pancreatic cancer model for the preclinical evaluation of chemotherapeutics // J Surg Res. 2003. V. 113(1). P. 151-60.

71. Kim, D., Gao, Z. G., Lee, E. S., & Bae, Y. H. In vivo evaluation of doxorubicin-loaded polymeric micelles targeting folate receptors and early endosomal pH in drug-resistant ovarian cancer // Molecular Pharmaceutics. 2009. V. 6(5). P. 1353–1362.

72. Kimura H, Zhang L, Zhao M, Hayashi K, Tsuchiya H, Tomita K, Bouvet M, Wessels J, Hoffman RM. Targeted therapy of spinal cord glioma with a genetically-modified Salmonella typhimurium // Cell proliferation 2010. V. 43(1). P. 41–48.

73. Khurana M, Ulrich S, Kim A, Moriyama Y, Netchev G, Akens MK, Anderson HL, Wilson BC. Biodistribution and pharmacokinetic studies of a porphyrin dimer photosensitizer (Oxdime) by fluorescence imaging and spectroscopy in mice bearing xenograft tumors // Photochem Photobiol. 2012. V. 88(6). P. 1531-8.

74. Klapshina LG, Douglas WE, Grigoryev IS, Ladilina EYu, Shirmanova MV, Mysyagin SA, Balalaeva IV, Zagaynova EV. Novel PEG-organized biocompatible fluorescent nanoparticles doped with an ytterbium cyanoporphyrazine complex for biophotonic applications // Chem Commun. 2010. V. 46. P. 8398-8400.

75. Kleshnin, M., Shirmanova, M., Fiks, I. Trans-illumination fluorescence imaging of deep-seated tumors in small animals // Photonics & Lasers in Medicine. 2014. V. 4(1). P. 85-92.

76. Kumar R, Shin WS, Sunwoo K, Kim WY, Koo S, Bhuniya S, Kim JS. Small conjugate-based theranostic agents: an encouraging approach for cancer therapy // Chem Soc Rev. 2015. V. 44 (19). P. 6670-6683.

77. Kuznetsova DS, Shirmanova MV, Dudenkova VV, Subochev PV, Turchin IV, Zagaynova EV. Photobleaching and phototoxicity of KillerRed in tumor spheroids induced by continuous wave and pulsed laser illumination // J. Biophotonics. 2015. V. 8(11-12). P. 952-60.

78. Lai CW, Chen HL, Yen CC, Wang JL, Yang SH, Chen CM. Using Dual Fluorescence Reporting Genes to Establish an In Vivo Imaging Model of Orthotopic Lung Adenocarcinoma in Mice // Mol Imaging Biol. 2016. V. 18(6). P. 849-859.

79. Lee S., Margolin K. Cytokines in cancer immunotherapy // *Cancers* 2011. V. 3. P. 3856–3893.

80. Leblond, F., Davis, S. C., Valdés, P. A., Pogue, B. W. Preclinical Whole-body Fluorescence Imaging: Review of Instruments, Methods and Applications // Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology. 2010. V. 98(1). P. 77–94.

81. Levine A. M. Low Dose Methotrexate, Bleomycin, Doxorubicin, Cyclophosphamide, Vincristine, and Dexamethasone with Zalcitabine in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome-Related Lymphoma // Cancer. 1996. V. 78(3). P. 517–526.

82. Liao H. Biomedical Information Processing and Visualization for Minimally Invasive Neurosurgery. In: Wu J, ed. Technological Advancements in Biomedicine for Healthcare Applications. IGI Global, Hershey, USA; 2012: P. 36-46.

83. Li L., Huh K.M. Polymeric nanocarrier systems for photodynamic therapy // Biomaterials Research, 2014 18:19.

84. Lim E-K, Kim T, Haam S, Huh Y-M, Lee K. Nanomaterials for Theranostics: Recent Advances and Future Challenges // Chem Rev. 2015. V. 115(1). P. 327-394.

85. Linch SN et al. OX40 Agonists and Combination Immunotherapy: Putting the Pedal to the Metal // Front Oncol. 2015. V. 5. P. 34.

86. Li Y., Huang Q., Zhong Y., Wang A., Sun J., Zhou J. Prospects in adoptive cell transfer therapy for cancer // J Immunol Clin Res. 2013. V. 1. P. 1008.

87. Li Y, Wang J, Zhang X, Guo W, Li F, Yu M, Kong X, Wu W, Hong Z. Highly water-soluble and tumor-targeted photosensitizers for photodynamic therapy // Org Biomol Chem. 2015. V. 13(28). P. 7681-94.

 Louie A. Multimodality Imaging Probes: Design and Challenges // Chem Rev. 2010. V. 110(5). P. 3146–3195.

89. Luker KE, Pata P, Shemiakina II, Pereverzeva A, Stacer AC, Shcherbo DS, Pletnev VZ, Skolnaja M, Lukyanov KA, Luker GD, Pata I, Chudakov DM. Comparative study reveals better far-red fluorescent protein for whole body imaging // Scientific Reports. 2015. V. 5. P. 10332.

90. Lustgarten J., Dominguez A. L., Thoman M. Aged Mice Develop Protective Antitumor Immune Responses with Appropriate Costimulation // J. Immunol. V. 2004. 173(7), P. 4510–4515.

91. Luo J, Chen L-F, Hu P, Chen Z-N. Tetranuclear Gadolinium(III) Porphyrin Complex as a Theranostic Agent for Multimodal Imaging and Photodynamic Therapy // Inorg Chem. 2014. V. 53(8). P. 4184–4191.

92. Mallidi, S., Spring, B. Q., Hasan, T. Optical Imaging, Photodynamic Therapy and Optically-Triggered Combination Treatments // Cancer Journal (Sudbury, Mass.). 2015. V. 21(3). P. 194–205.

93. 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. V. 1850(11). P. 2318-28.

94. Major AL. Rose GS, Chapman CF, Hiserodt JC, Tromberg BJ, Krasieva TB, Tadir Y, Haller U, DiSaia PJ, Berns MW. In vivo fluorescence detection of ovarian cancer in the NuTu-19 epithelial ovarian cancer animal model using 5-aminolevulinic acid (ALA) // Gynecol Oncol. 1997. V. 66(1). P. 122-32.

95. Meleshina, A. V., Cherkasova, E. I., Shirmanova, M. V., Klementieva, N. V., Kiseleva, E. V., Snopova, L. B., Zagaynova, E. V. Influence of mesenchymal stem cells on metastasis development in mice in vivo // Stem Cell Research & Therapy. 2015. V. 6(1). P. 15.

96. Mehraban, N., Freeman, H. S. Developments in PDT Sensitizers for Increased Selectivity and Singlet Oxygen Production // Materials, 2015. V. 8(7). P. 4421–4456.

97. Mo W, Rohrbach D, Sunar U. Imaging a photodynamic therapy photosensitizer in vivo with a time-gated fluorescence tomography system // J Biomed Opt. 2012. V. 17(7). P. 071306.

98. Mironova KE, Proshkina GM, Ryabova AV, Genetically Encoded Immunophotosensitizer 4D5scFv-miniSOG is a Highly Selective Agent for Targeted Photokilling of Tumor Cells In Vitro // Theranostics. 2013. V. 3(11). P. 831-840.

99. Motlagh, N. S. H., Parvin, P., Ghasemi, F., Atyabi, F. Fluorescence properties of several chemotherapy drugs: doxorubicin, paclitaxel and bleomycin // Biomedical Optics Express. 2016. V. 7(6). P. 2400–2406.

100. Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., Hamblin, M. R. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer // Cancers, 2011. V. 3(2). P. 2516– 2539.

101. Nam T, Park S, Lee SY, Park K, Choi K, Song IC, Han MH, Leary JJ, Yuk SA, Kwon IC, Kim K, Jeong SY. Tumor targeting chitosan nanoparticles for dual-modality optical/MR cancer imaging // Bioconjug Chem. 2010. V. 21(4). P. 578-582.

102. Nunez-Cruz S, Connolly DC, Scholler N. An Orthotopic Model of Serous Ovarian Cancer in Immunocompetent Mice for in vivo Tumor Imaging and Monitoring of Tumor Immune Responses // Journal of Visualized Experiments. 2010. V. (45). V. 2146.

103. Ozturk MS, Rohrbach D, Sunar U, Intes X. Mesoscopic fluorescence tomography of a photosensitizer (HPPH) 3D biodistribution in skin cancer // Acad Radiol. 2014. V. 21(2). P. 271-80.

104. Patel N, Pera P., Joshi P., Dukh M., Tabaczynski W. A., Siters K. E., Kryman M., Cheruku R. R., Durrani F., Missert J. R., Watson R., Ohulchanskyy T. Y., Tracy E. C., Baumann H., Pandey R. K.. Highly Effective Dual-Function Near-Infrared (NIR) Photosensitizer for Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy (PDT) of Cancer // J Med Chem. 2016. V. 59(21). P. 9774-9787.

105. Platten M., Wick W., Van den Eynde B.J. Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion // Cancer Res. 2012. V. 72(21). P. 5435–5440.

106. Pletnev S., Gurskaya N.G., Pletneva N.V., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Martynov V.I., Popov V.O., Kovalchuk M.V., Wlodawer A., Dauter Z., Pletnev V. Structural basis for phototoxicity of the genetically encoded photosensitizer KillerRed // J Biol Chem. 2009. V. 284(46). P. 32028–32039.

107. Qi YB, Garren EJ, Shu X, Tsien RY, Jin Y. Photo-inducible cell ablation in Caenorhabditis elegans using the genetically encoded singlet oxygen generating protein miniSOG // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012. V. 109(19). P. 7499-7504.

108. Raval R.R., Sharabi A.B., Walker A.J., Drake C.G., Sharma P. Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer // J Immunother Cancer. 2014. V. 2. P. 14.

109. Redmond W.L, Gough MJ, Charbonneau B. Defects in the Acquisition of CD8 T Cell Effector Function after Priming with Tumor or Soluble Antigen Can Be Overcome by the Addition of an OX40 Agonist // J Immunol. 2007. V. 179(11). P. 7244-53.

110. Reuter, D., Staege, M. S., Kühnöl, C. D., Föll, J. Immunostimulation by OX40 Ligand Transgenic Ewing Sarcoma Cells // Frontiers in Oncology, 2015. V. 5.P. 242.

111. Rezzoug H, Bezdetnaya L, A'amar O, Merlin L, Guillemin F. Parameters affecting photodynamic activity of foscan® or meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) *In Vitro* and *In Vivo* // Lasers Med Sci. 1998. V. 13. P. 119–125.

112. Ruby C.E, Redmond W.L, Haley D. Anti-OX40 stimulation in vivo enhances CD8+ memory T cell survival and signifi-cantly increases recall responses // Eur J Immunol. 2007. V. 37. P. 157–166.

113. Ruby CE, Yates MA, Hirschhorn-Cymerman D, Chlebeck P, Wolchok JD, Houghton AN, Offner H, Weinberg AD. Cutting Edge: OX40 agonists can drive regulatory T cell expansion if the cytokine milieu is right // J Immunol. 2009. V. 183(8). P. 4853-7.

114. Rudkouskaya A, Sinsuebphon N, Intes X, Mazurkiewicz JE, Barroso M. Fluorescence lifetime FRET imaging of receptor-ligand complexes in tumor cells in vitro and in vivo // Proc. SPIE 10069, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XVII. 2017. V. 1006917.

115. Ryumina AP, Serebrovskaya EO, Shirmanova MV, Snopova LB, Kuznetsova MM, Turchin IV, Ignatova NI, Klementieva NV, Fradkov AF, Shakhov BE, Zagaynova EV, Lukyanov KA, Lukyanov SA. Flavoprotein miniSOG as a genetically encoded photosensitizer for cancer cells // Biochim Biophys Acta. 2013. V. 1830(11). P. 5059-67.

116. Salek-Ardakani S, Moutaftsi M, Crotty S. OX40 drives protective vaccinia virus-specific CD8 T cells // J Immunol. 2008. V. 181. P. 7969–7976.

117. Sarkisyan KS, Zlobovskaya OA, Gorbachev DA, Bozhanova NG, Sharonov GV, Staroverov DB, Egorov ES, Ryabova AV, Solntsev KM, Mishin AS, Lukyanov KA. KillerOrange, a Genetically Encoded Photosensitizer Activated by Blue and Green Light // PLoS ONE. 2015. V. 10(12). P. e0145287.

118. Steinbauer M, Guba M., Cernaianu G., Köhl G., Cetto M., Kunz-Schughart L. A., Geissler E. K., Falk W., Jauch K.-W. GFP-transfected tumor cells are useful in examining early metastasis in vivo, but immune reaction precludes longterm tumor development studies in immunocompetent mice // Clin. Exp. Metastasis. 2003. V. 20(2). P. 135–141.

119. Stripecke R, Carmen Villacres M, Skelton D, Satake N, Halene S, KohnD. Immune response to green fluorescent protein implications for gene therapy //Gene Ther. 1999. V. 6(7). P. 1305–1312.

120. Schellenberger EA, Bogdanov A Jr, Petrovsky A, Ntziachristos V, Weissleder R, Josephson L. Optical imaging of apoptosis as a biomarker of tumor response to chemotherapy. Neoplasia // 2003. V. 5(3). P. 187-92.

121. Schlom J. Therapeutic cancer vaccines: current status and moving forward. J Natl Cancer Inst. 2012. V. 104(8). P. 599–613.

122. Scott A.M., Wolchok J.D., Old L.J. Antibody therapy of cancer // Nat Rev Cancer. 2012. V. 12(4). P. 278–287.

123. Serebrovskaya EO, Gorodnicheva TV, Ermakova GV, Solovieva EA, Sharonov GV, Zagaynova EV, Chudakov DM, Lukyanov S, Zaraisky AG, Lukyanov KA. Light-induced blockage of cell division with a chromatin-targeted phototoxic fluorescent protein // Biochem. J. 2011. V. 435(1). P. 65–71.

124. Skelton D., Satake N., Kohn D. B. The enhanced green fluorescent protein (eGFP) is minimally immunogenic in C57BL/6 mice // Gene Therapy. 2001. V. 8(23). P. 1813–1815.

125. Skala MC, Riching K. M., Gendron-Fitzpatrick A., Eickhoff J., Eliceiri K. W., White J. G., Ramanujam N. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia // Proc Natl Acad Sci USA. 2007. V. 104(49). P. 19494-9.

126. Shah AT, Diggins KE, Walsh AJ, Irish JM, Skala MC. In Vivo Autofluorescence Imaging of Tumor Heterogeneity in Response to Treatment // Neoplasia. 2015. V. 17(12). P. 862-870.

127. Shcheslavskiy V., Shirmanova M., Dudenkova V., Lukyanov K., Gavrina A., Shumilova A., Zagaynova E., Becker W. Fluorescence Time-resolved Macroimaging // Optics Letters. 2018. Accepted 05/08/2018.

128. Sheng C, Hoopes PJ, Hasan T, Pogue BW. Photobleaching-based dosimetry predicts deposited dose in ALA-PpIX PDT of rodent esophagus // Photochem Photobiol. 2007. V. 83(3). P. 738-748.

129. Shibahara, I., Saito, R., Zhang, R., Chonan, M., Shoji, T., Kanamori, M., Tominaga, T. OX40 ligand expressed in glioblastoma modulates adaptive immunity depending on the microenvironment: a clue for successful immunotherapy // Molecular Cancer. 2015. V. 14. P. 41.

130. Shimizu Y. Temma T, Hara I, Makino A, Kondo N, Ozeki E, Ono M, Saji H. In vivo imaging of membrane type-1 matrix metalloproteinase with a novel activatable near-infrared fluorescence probe // Cancer Sci. 2014. V. 105(8). P. 1056-62.

131. Shimolina, L. E., Izquierdo, M. A., López-Duarte, I., Bull, J. A., Shirmanova, M. V., Klapshina, L. G., Kuimova, M. K. Imaging tumor microscopic viscosity in vivo using molecular rotors // Scientific Reports. 2017. V. 7. P. 41097.

132. Shirmanova MV, Balalaeva I. V., Lekanova N. Yu., Mysyagin S. A., Brilkina A. A., Klapshina L. G., Zagaynova E. V. Design and testing of a new photosensitizer based on an ytterbium porphyrazine complex // Biophysics. 2011. V. 56(6). P 1083–1087.

133. Shirmanova MV, Serebrovskaya EO, Lukyanov KA, Snopova LB, Sirotkina MA, Prodanetz NN, Bugrova ML, Minakova EA, Turchin IV, Kamensky VA, Lukyanov SA, Zagaynova EV // Phototoxic effects of fluorescent protein KillerRed on tumor cells in mice. Journal of Biophotonics. 2013. V. 6(3). P. 283–290.

134. Shirmanova MV, Gavrina AI, Aksenova NA, Glagolev NN, Solovieva AB, Shakhov BE, Zagaynova EV. Comparative study of tissue distribution of chlorin e6 complexes with amphiphilic polymers in mice with cervical carcinoma // J Anal Bioanal Tech. 2014. V. S1. P. 008.

135. Shirmanova MV, Druzhkova IN, Lukina MM, Matlashov ME, Belousov VV, Snopova LB, Prodanetz NN, Dudenkova VV, Lukyanov SA, Zagaynova EV. Intracellular pH imaging in cancer cells in vitro and tumors in vivo using the new

genetically encoded sensor SypHer2 // Biochim Biophys Acta. 2015. V. 1850(9). P. 1905-11.

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

137. Shu X, Lev-Ram V, Deerinck TJ, Qi Y, Ramko EB, Davidson MW, et al. A Genetically Encoded Tag for Correlated Light and Electron Microscopy of Intact Cells, Tissues, and Organisms // PLoS Biol. 2011. V. 9(4). P. e1001041.

138. Sirotkina MA. Matveev L. A., Shirmanova M. V., Zaitsev V. Y., Buyanova N. L., Elagin V. V., Gelikonov G. V., Kuznetsov S. S., Kiseleva E. B., Moiseev A. A., Gamayunov S. V., Zagaynova E. V., Feldchtein F. I., Vitkin A., Gladkova N. D. Photodynamic therapy monitoring with optical coherence angiography // Scientific Reports. 2017. V. 7. P. 41506.

139. Souslova EA, Mironova KE, Deyev SM. Applications of genetically encoded photosensitizer miniSOG: from correlative light electron microscopy to immunophotosensitizing // J Biophotonics. 2016. V. 2016. P. 1-15.

140. Tran Cao, H. S., Reynoso, J., Yang, M., Kimura, H., Kaushal, S., Snyder, C. S., Bouvet, M. Development of the Transgenic Cyan Fluorescent Protein (CFP)-Expressing Nude Mouse for "Technicolor" Cancer Imaging // Journal of Cellular Biochemistry. 2009. V. 107(2). P. 328–334.

141. Töpfer K., Kempe S., Müller N., Schmitz M., Bachmann M., Cartellieri M., Schackert G., Temme A. Tumor evasion from T cell surveillance // J Biomed Biotechnol. 2011. V. 2011. P. 918471.

142. Tuchin V.V. Tissue Optics and Photonics: Biological Tissue Structures //J. of Biomedical Photonics & Eng. 2015. V. 1(1). P. 3-21.

143. Vasquez, K. O., Casavant, C., Peterson, J. D. Quantitative Whole Body Biodistribution of Fluorescent-Labeled Agents by Non-Invasive Tomographic Imaging // PLoS ONE. 2011. V. 6(6). P. e20594. 144. Vollet-Filho J. D., P Menezes. F. C., Moriyama L. T., Grecco C., Sibata C., Allison R. R., Castro e Silva O., Bagnato V. S. Possibility for a full optical determination of photodynamic therapy outcome // J. Appl. Phys. V. 2009. 105. P. 102038.

145. Wada S, Yoshimura K., Hipkiss EL. Cyclophosphamide Augments Antitumor Immunity: Studies in an Autochthonous Prostate Cancer Model // Cancer Res. 2009. V. 69(10). P. 4309–4318.

146. Waldeck W, Mueller G, Wiessler M, Tóth K., Braun K. Positioning Effects of KillerRed inside of Cells correlate with DNA Strand Breaks after Activation with Visible Light // International Journal of Medical Sciences, 2011. V. 8(2). P. 97–105.

147. Wang LV, Wu H-I. Biomedical Optics: Principles and Imaging, Wiley-Intersience, Hoboken, NJ – 2007 – P. 376.

148. Webb GJ, Hirschfield GM, Lane PJ. OX40, OX40L and Autoimmunity: a Comprehensive Review // Clin Rev Allergy Immunol. 2016. V. 50(3). P. 312-32.

149. Winnard PT, Kluth JB, Raman V. Noninvasive Optical Tracking of Red Fluorescent Protein-Expressing Cancer Cells in a Model of Metastatic Breast Cancer // Neoplasia. 2006. V. 8(10). P. 796–806

150. Wilson BC, Patterson MS, Lilge L. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a New paradigm // Lasers in Medical Science. 1997. V. 12. P. 182-199.

151. Wojtovich AP, Wei AY, Sherman TA, Foster TH, Nehrke K. Chromophore-Assisted Light Inactivation of Mitochondrial Electron Transport Chain Complex II in Caenorhabditis elegans // Scientific Reports. 2016. V. 6. P. 29695.

152. Wolfbeis OS. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging // Chem Soc Rev. 2015. V. 44(14). P. 4743-4768.

153. Xiao X, Gong W, Demirci G, Liu W, Spoerl S, Chu X, Bishop DK, Turka LA, Li XC. New insights on OX40 in the control of T cell immunity and immune tolerance in vivo // J Immunol. 2012. V. 188(2). P. 892-901.

154. Xu S, Chisholm AD. Highly efficient optogenetic cell ablation in C. elegans using membrane-targeted miniSOG // Sci Rep. 2016. V. 6. P. 21271.

155. Yamaoka N, Kawasaki Y, Xu Y, Yamamoto H, Terada N, Okamura H, Kubo S. Establishment of in vivo fluorescence imaging in mouse models of malignant mesothelioma // Int J Oncol. 2010. V. 37(2). P. 273-9.

156. Yamamoto N, Tsuchiya H, Hoffman RM. Tumor imaging with multicolor fluorescent protein expression // Int J Clin Oncol. 2011. V. 16(2). P. 84-91.

157. Yang M, Reynoso J, Jiang P, Li L, Moossa AR, Hoffman RM. Transgenic nude mouse with ubiquitous green fluorescent protein expression as a host for human tumors // Cancer Res. 2004. V. 64(23). P. 8651-6.

158. Yang Z, Leon J, Martin M, Harder JW, Zhang R, Liang D, Li C. Pharmacokinetics and biodistribution of near-infrared fluorescence polymeric nanoparticles // Nanotechnology. 2009. V. 20(16). P. 165101.

159. Yu ZQ, Zhou JH, Tao KT, Hu L, Zheng J, Yang DT. Establishment of red fluorescent protein orthotopic transplantation nude mice metastasis model of pancreatic cancer and whole-body fluorescent imaging // Zhonghua Wai Ke Za Zhi. 2009. V. 47(14). P. 1092-5.

160. Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression // Int J Biol Sci 2011. V. 7(5). P. 651–658.

161. Zdobnova T, Sokolova E, Stremovskiy O, Karpenko D, Telford W, Turchin I, Deyev S. A novel far-red fluorescent xenograft model of ovarian carcinoma for preclinical evaluation of HER2-targeted immunotoxins // Oncotarget, 2015. V. 6(31). P. 30919–30928.

162. Zhou J. Advances and prospects in cancer immunotherapy // New Journal of Science 2014. V. 2014. P. 1–13.

163. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy // Nat Rev Immunol. 2006. V. 6(4). P. 295–307.