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

July

На правах рукописи

Лукина Мария Максимовна

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

03.01.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: к.б.н., Ширманова М.В.

Нижний Новгород – 2019

## оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Кофакторы НАД(Ф)Н и ФАД	12
1.2. Особенности энергетического метаболизма опухолевых клеток	17
1.3. Оптический метаболический имиджинг	20
1.3.1. Редокс-отношение на основе интенсивности флуоресценции	
метаболических кофакторов НАДН и ФАД	20
1.3.2. Флуоресцентный время-разрешенный имиджинг (FLIM)	22
1.4. Клинические критерии ответа опухоли на химиотерапию	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	34
2.1. Объекты исследования	34
2.2. Методики исследования	35
ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	43
3.1. Исследование метаболических изменений в опухолевых клетках	
монослойной клеточной культуры HeLa Kyoto при химиотерапии	43
3.1.1. Исследование метаболических изменений в опухолевых клетках	
монослойной клеточной культуры HeLa Kyoto при химиотерапии	
цисплатином	43
3.1.2. Исследование метаболических изменений в опухолевых клетках	
монослойной клеточной культуры HeLa Kyoto при химиотерапии	
паклитакселом	47
3.2. Метаболический имиджинг опухолевых сфероидов HeLa Kyoto при	
химиотерапии	53
3.2.1. Метаболический имиджинг опухолевых сфероидов HeLa Kyoto при	
химиотерапии цисплатином	53
3.2.2. Метаболический имиджинг опухолевых сфероидов HeLa Kyoto при	
химиотерапии паклитакселом	59

3.3. In vivo флуоресцентная микроскопия с временным разрешением	
НАД(Ф)Н в мышиных опухолевых моделях при химиотерапии	64
3.3.1. In vivo флуоресцентная микроскопия с временным разрешением	
НАД(Ф)Н в опухоли HeLa Kyoto при химиотерапии цисплатином	64
3.3.2 <i>In vivo</i> флуоресцентная время-разрешенная микроскопия НАД(Ф)Н	
опухоли СТ26 при химиотерапии препаратами с разным механизмом	
действия	69
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	84
ВЫВОДЫ	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	88

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – Аденозинтрифосфорная кислота

НАДН – Никотинамидадениндинуклеотид

НАДФ – Никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ФАД – Флавинадениндинуклеотид

LipDH – lipdh - Dihydrolipoyl dehydrogenase – Дигидролипоилдегидрогеназы

HIFs – Hypoxia-inducible factors – Факторы, индуцируемые гипоксией

PI3K – Phosphoinositide 3-kinase – Фосфоинозитид-3-киназа

АКТ – Протеинкиназа

mTOR – mammalian target of rapamycin – Мишень рапамицина у млекопитающих

NFkB – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – Ядерный фактор «каппа-би»

FLIM – Fluorescence Lifetime Imaging – Флуоресцентная микроскопия с временным разрешением

PBS – phosphate buffered saline – Фосфатно-солевой буфер

TCSPC – Time-Correlated Single Photon Counting – времякоррелированный счёт единичных фотонов

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium – среда для культивирования клеток

FBS – Fetal bovine serum – Фетальная бычья сыворотка

SPF – Specific Pathogen Free – без патогенов

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

PI – Propidium iodide – Пропидиумом иодидом

YFP – Yellow fluorescent protein – Жёлтый флуоресцентный белок

#### введение

#### Актуальность проблемы

Известно, что энергетический метаболизм многих опухолевых клеток характеризуется высокой интенсивностью гликолиза даже в присутствии кислорода, что связано с их активным ростом и пролиферацией [1-3]. Также, гликолиз способствует снижению образования свободных радикалов, что минимизирует вероятность генотоксических повреждений в клетке и способствует уходу от апоптоза [4]. В отличие от опухолевых клеток, в нормальных клетках основным источником АТФ является окислительное фосфорилирование.

В роли переносчиков электронов и протонов в реакциях энергетического метаболизма НАД/НАДН выступают кофакторы клетки (никотинамидадениндинуклеотид) ФАД/ФАДН2 И НАДН (флавинадениндинуклеотид). Восстановленный И его фосфорилированная форма НАДФН (суммарно обозначаемые НАД(Ф)Н) и окисленная форма ФАД способны к автофлуоресценции [5]. На регистрации метаболических флуоресценции кофакторов основан оптический метаболический имиджинг, который включает в себя анализ отношения интенсивностей флуоресценции (редокс-отношение) и время-разрешенный флуоресцентный имиджинг (FLIM) [6-9]. Редокс - отношение дает информацию об общей метаболической активности клетки. Тогда как с помощью FLIM можно анализировать времена жизни флуоресценции НАД(Ф)Н. Кофактор  $HAД(\Phi)H$  находится в клетке в свободном и связанном с белками состояниях, которые практически идентичны по спектральным характеристикам, но значительно отличаются по времени жизни флуоресценции [6, 8-14]. Таким образом, FLIM дает возможность различать свободные и связанные формы НАД(Ф)Н в живых клетках и тканях в режиме реального времени. Короткое время жизни флуоресценции НАД( $\Phi$ )H (t1) соответствуют его свободной (не связанной с белком) форме, длинное время жизни флуоресценции (t2) -

связанной с белками форме. Свободная форма НАДН, главным образом, сопряжена с процессами субстратного фосфорилирования и, соответственно находится в цитозоле клетки. В свою очередь форма НАДН связанная с различными белками является участником окислительного фосфорилирования, сосредоточенного в межмембранном пространстве митохондрий [15, 16]. Фосфорилированный аналог НАДФН, непосредственно, В реакциях энергетического обмена клетки участия не принимает, однако, играет роль в синтетических реакциях (производство жирных кислот, стероидов И кератиноидов). регулировании клеточных сигналов и антиоксидантных системах. НАДФН обладает более длинными временами жизни флуоресценции (4.4 нс) и концентрация его в опухолевых клетках крайне мала [17].

Традиционные методы анализа энергетического метаболизма, такие как позитронно-эмиссионная томография с 18F-фтордезоксиглюкозой, массспектрометрия и биохимические исследования имеют ряд недостатков. В частности, требуют введения контрастирующего агента, реализуются на дорогостоящем оборудовании, имеют сложные протоколы приготовления препаратов. Перспективным методом в области исследования энергетического обмена является флуоресцентный время-разрешенный имиджинг кофактора НАДН. Бесспорными преимуществами являются данного метода высокая чувствительность, биологическая безопасность, неинвазивность, отсутствие необходимости в применении экзогенных красителей. Метод дает метаболические уникальную анализировать особенности возможность опухолевых клеток без дополнительной подготовки, вмешательств И окрашивания. Флуоресцентный время-разрешенный имиджинг НАД(Ф)Н является новым методом и на сегодняшний день реализован, в основном, на монослойных культурах in vitro для задач поиска отличий между опухолевыми и нормальными клетками [16, 18, 19] и оценки ответа клеток на лечение [20, 21]. Исследования энергетического метаболизма при канцерогенезе in vivo ограничены единичными работами [15, 22]. В связи с этим, актуальной задачей является разработка методических подходов к оценке метаболизма в сложных и

классических опухолевых моделях и оценка возможностей флуоресцентного время-разрешенного имиджинга для мониторинга эффективности противоопухолевой химиотерапии.

#### Цели и задачи работы

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

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

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

2. Методом флуоресцентной время-разрешенной микроскопии исследовать изменения параметров флуоресценции метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в процессе химиотерапии в монослойных клеточных культурах.

3. Методом флуоресцентной время-разрешенной микроскопии исследовать изменения параметров флуоресценции метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в процессе химиотерапии в опухолевых сфероидах.

4. Оценить влияние химиопрепаратов с различным механизмом действия на параметры флуоресценции метаболического кофактора НАД(Ф)Н опухолевых клеток на основе флуоресцентной время-разрешенной микроскопии в опухолях мышей in vivo.

#### Научная новизна

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

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

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

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

#### Научно-практическая значимость

В работе показана возможность прижизненного неинвазивного исследования опухолевого метаболизма на всех уровнях организации: монослойных клеточных культурах, сфероидах, опухолях животных in vivo.

Разработаны универсальные методики по изучению опухолевого метаболизма в живых объектах на основе флуоресцентной время-разрешенной микроскопии эндогенных кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД и проведено комплексное исследование изменений энергетического метаболизма для опухолевых моделей с различной организацией под действием химиотерапии. С помощью разработанных методик были установлены однонаправленные изменения метаболических параметров in vitro и in vivo в ответ на химиотерапию препаратами с различным механизмом действия.

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

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

## Основные положения, выносимые на защиту:

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

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

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

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

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

## Публикации

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

## Достоверность полученных результатов

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

#### Апробация работы

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на II Всероссийской XIII Межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2015 г.); XII Всероссийской

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

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Кофакторы НАД(Ф)Н и ФАД

Основными источниками энергии в клетке являются реакции окислительного фосфорилирования и гликолиза, в результате которых образуется АТФ [23, 24]. НАД(Ф)Н и ФАД являются двумя основными кофактарами, которые участвуют в клеточном дыхании [23, 25-32].

Гликолиз (субстратное фосфорилирование) является метаболическим путем, при котором происходит превращение глюкозы C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> в пируват СН<sub>3</sub>СОСОО<sup>-</sup> + Н<sup>+</sup> и представляет собой последовательность из десяти ферментативных реакций. В результате этого многоэтапного процесса образуется две высокоэнергетические молекулы АТФ, две молекулы пирувата, и две молекулы воды, при этом два НАД<sup>+</sup> восстанавливаются до двух НАДН (реакция субстратного фосфорилирования) (рисунок 1) [4, 33]. Далее молекула пирувата переходит из цитозоля клетки в митохондрии, где происходит ее превращение В ацетил-коэнзим-А В ходе декарбоксилирования И дегидрирования. Данные процессы происходят с использованием мультиферментного пируватдегидрогеназного комплекса, который включает в себя следующие ферменты: дигидролипоилтрансацетилазы, пируватдекарбоксилазы И дигидролипоилдегидрогеназы (LipDH), И коферментов: липоевой кислоты, тиаминдифосфата, коэнзима А, ФАД и НАД<sup>+</sup> [10]. После чего ацетил-коэнзим-А включается в цикл трикарбоновых кислот. Большое количество дегидрогеназных комплексов, находящиеся В митохондриях, принимают участие в контроле количестве восстановленного и окисленного НАДН, выступающего в качестве донора электронов и протонов для электрон-транспортной цепи митохондрий [34-36].

# С<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> + 2АДФ + 2H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 2HAД<sup>+</sup> = 2C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub> + 2HAДH + 2H<sup>+</sup> + 2ATФ + 2H<sub>2</sub>O

Рисунок 1. Суммарное уравнение гликолиза.

Одним из наиболее энергоэффективных процессов синтеза АТФ считается окислительное фосфорилирование. В реакциях окислительного фосфорилирования НАДН выступает, как первичным донор, тогда как ФАД является первичным акцептором протонов и электронов в электронтранспортной цепи митохондрий. При идеальной эффективности в аэробных условиях один атом глюкозы приводит к образованию 10 молекул НАДН и 2 молекул ФАДН<sub>2</sub>. НАДН и ФАДН<sub>2</sub> затем окисляются в электрон-транспортной цепи митохондрии, образуя при этом протонный градиент (электрохимический потенциал) и генерируя 3 и 2 АТФ на молекулу, соответственно. [37]. Энергия электрохимического потенциала необходима для производства АТФ с использованием АТФ-синтетазы [38, 39].

Схематично роль кофакторов в процессах метаболизма клетки представлено на рисунке 2 [40].



Рисунок 2. Реакции энергетического метаболизма клетки с участием кофакторов НАДН и ФАД [40]

Тем не менее, гликолиз, как древний путь образования энергии, сохранившийся в процессе эволюции, также влияет на энергетический метаболизм в определенных органах и тканях человека, таких как мозг, печень и мышцы [41]. Фактически, гликолиз и окислительное фосфорилирование тесно связаны. Гликолиз протекает в цитоплазме клетки и в результате его реакций образуются две молекулы АТФ. Пируват является конечным продуктом гликолиза, который используется в качестве топлива для митохондриального дыхания. В аэробных условиях пируват попадает в митохондрии, которые окисляются до ацетил-коэнзим - А, и в сочетании с оксалоацетатом запускает цикл трикарбоновых кислот и окислительное фосфорилирование, который ATΦ. В продуцировать 36 анаэробных условиях может пируват восстанавливается до лактата лактатдегидрогеназой А в цитоплазме, а затем выводится внеклеточное пространство с лактат BO помощью монокарбоксилатных переносчиков [41].

Выработка АТФ является ответом на потребность клетки в энергии и условий варьируется В зависимости ОТ И микроокружения. Клетки млекопитающих используют реакции гликолиза И окислительного фосфорилирования для образования АТФ. Однако отношение вклада гликолиза в сравнении с митохондриальным дыханием к общему объему образования АТФ варьируется в зависимости от типа клеток, их состояния, фазы роста и микроокружения. В условиях гипоксии ГЛИКОЛИЗ усиливается, чтобы компенсировать снижение интенсивности митохондриального дыхания. Следовательно, гликолиз и оксилительное фосфорилирование взаимодействуют для поддержания энергетического баланса клетки. Предполагается, что в норме общий АТФ является постоянной величиной, если функция дыхания ослаблена, функция гликолиза должна быть усилена, чтобы поддерживать баланс энергии. Напротив, если функция дыхания нормальная, она будет регулировать гликолитическую активность различными путями для поддержания баланса энергии [3, 36, 42].

Коферменты НАДН ФАД обладают собственными И автофлуоресцентными характеристиками [6]. Спектры поглощения и эмиссии данных кофакторов приведены на рисунке 3. Спектральные характеристики флуоресценции метаболических кофакторов НАДН И ФАД детально представлены на рисунке 3. Максимум поглощения НАДН на длине волны 355 нм, для кофактора ФАД - на 370 нм и 450 нм [5, 43, 44].



Рисунок 3. Спектральные характеристики флуоресценции метаболических кофакторов НАДН (А) и ФАД (Б).

Фосфорилированная форма кофактора НАДФН обладает идентичными флуоресцентным профилем, что и нефосфорилированная форма НАДН, однако, напрямую, в реакциях энергетического метаболизма клетки не задействована [17]. В клетке главным поставщиком НАДФН выступает пентозный шунт. НАДФН играет важную роль в биосинтетических процессах [45], а также же аскорбат-глутатионовой посредством системы защищает клетки ОТ губительного воздействия активных форм кислорода. Окисленная форма НАД $\Phi^+$  контролирует гомеостаза ионов кальция (Ca<sup>2+</sup>) в клетке [26-28, 30]. В абсолютная литературных ланных показало. что концентрация нефосфорилированной формы НАДН в клетке значительно выше (примерно в 33 раз), чем НАДФН, однако, квантовый выход флуоресценции НАДФН в 1.25 - 2.5 раза выше [46-48]. В исследовании реакций энергетического статуса клетки вкладом НАДФН, в основном, пренебрегают. Однако, анализ НАД(Ф)Н представляет большой интерес для задач. связанных с корреляцией энергетических и синтетических процессов в клетке [49].

Молекула НАДН образуется в результате гликолиза в цитоплазме, а также при декарбоксилирования пирувата в ацетил-кофермент А и в цикле Креба, оба процесса происходят в митохондриальном матриксе. Кофактор НАДН в клетке бывает как в свободной, так и связанной с белками формах [16].

Свободная форма НАДН находится в цитоплазме клетки и, имеет спектр эмиссии в синем диапазоне. Тогда как связанная с белком форма кофактора НАДН локализуется в митохондриях и ее спектр эмиссии сдвинут на 20 нм в более длинноволновую область, по сравнению со свободной формой НАДН [5]. В связанном с белками состоянии квантовый выход флюоресценции НАДН возрастает до 4 раз (с 0.02 до 0.1), время жизни флюоресценции увеличивается с 0.3 нс до 1.7-2.9 нс. Потому вклад в интенсивность флуоресценции, преимущественно, вносит именно связанная с белком форма НАДН [44].

В клетке кофактор ФАД входит в состав ферментативного комплекса митохондрий и всегда ковалентно связан с ферментами – флавопротеинами [50]. Флуоресценция ФАД тушится большей частью данных белковых комплексов, а именно сукцинатдегидрогеназой, которая является главным ферментом цикла трикарбоновых кислот и вторым комплексом электронтранспортной цепи митохондрий [51].

Интерпритация И метаболичских правильная трактовка значения кофакторов в энергетических и синтетических процессах клетки играет ключевую роль для корректного и полного понимания результатов выявленных с использованием оптического метаболического имиджинга [17, 49]. НАДН находится в цитозоле и митохондриях и задействован, в основном, в реакциях 52, 53], метадолизма клетки [15, ФАД энергетического тогда как локализируется только в митохондриях, используется, кроме окислительного фосфорилирования, в ряде биохимических реакций включая: перенос электронов, репарацию ДНК, биосинтез нуклеотидов, β-окисление жирных кислот и катаболизм аминокислот, а также в синтезе других кофакторов, таких как кофермент-А, коэнзим-Q и гемовые группы, также утилизацию глутатиона, липогенеза, перекисном окисление липидов, антиоксидантный реакции, пентозофосфатном цикле, что не дает в полной мере разделить вклады синтетического и энергетического обмена в общем метаболизме клетки.

## 1.2. Особенности энергетического метаболизма опухолевых клеток

Главным поставщиком молекул АТФ в клетки является окислительное фосфорилирование. Тогда как индикатором опухолевых клеток является перепрограммированный метаболизм глюкозы (переход от окислительного фосфорилирования к интенсивному гликолизу), что связано с их высоко активным пролиферативным потенциалом. [24, 54].

Другой характерной чертой солидных опухолей является гипоксия является [42]. Известно, что из-за высокой скорости деления, в опухоли не обладает успевают образовываться новые сосуды И она атипично организованным сосудистым руслом с низкой площадью покрытия. В связи с эти в опухоли появляются участки, к которым не подходят сосуды и в них снижен приход питательных веществ и кислорода [55]. В данных участках генерируется острая гипоксия. Она также возникает в связи с несоответствием количества поступающего к опухолевым клеткам кислорода и потребляемого ими. [56]. Однако, опухоль может адаптироваться к условиям пониженного содержания кислорода, и гипоксия, даже, способствует опухолевой инвазии, метастазированию и резистентности к противоопухолевой терапии. [57-59]. При гипоксии запускается серия каскадов сигнальных молекулярных путей, таких как HIFs, PI3K/AKT/mTOR, MARK, NFkB, регулирующих процессы воспаления, пролиферации, апоптоза, выживания, миграции и метаболизма. Однако, такие молекулярные пути, HIF1 и mTOR имеют наибольшее влияние на контроль метаболического статуса опухолевой [60-62]. HIF1 выступает в качестве основного индуктора обмена глюкозы в клетки при сниженном содержании кислорода [63]. Молекулярный mTOR путь вовлечен в активацию гликолиза, синтеза липидов, аминокислот, нуклеотидов и белков. В итоге, при гипоксии опухолевые клетки теряют возможность использовать окислительный метаболизм для синтеза АТФ, что способствует их к переключению на субстратное фосфорилирование [57, 62, 64].

Одна из метаболических особенностей опухолевых клеток состоит в том, чтобы активно превращать глюкозу посредством гликолиза в АТФ даже в присутствии кислорода [42, 65]. Описанный феномен описал Отто Варбург в

1920х гг и дал ему название «аэробный гликолиз» (впоследствии, его также стали называть эффектом Варбурга) [2, 24, 66]. Ученый предполагал, что превалирование субстратного фосфорилирования в условиях нормальной оксигенации спровоцировано функциональными патологиями митохондрий. На самом деле, что установили позднее, дисфункции митохондрий имеют не все опухолевые клетки [67]. К дисфункциям митохондрий относятся следующие изменения: сниженная экспрессия белков-переносчиков И ферментов, принимающих участие в окислительно-восстановительных реакциях, неполный цикл Кребса, редуцированное количество митохондрий, дефекты в структуре комплексов дыхательной цепи, увеличенное количество ингибиторов митохондриальной АТФ-синтазы, чувствительность мДНК к окислительному стрессу [68]. Также было выявлено, что блокировка гликолиза приводила к возобновлению функции митохондрий у большинства опухолевых клеток и переключению метаболизма на окислительное фосфорилирование [69, 70].

Интенсивный гликолиз в опухоли обусловлено следующими особенностями [71]. В первую очередь, опухолевые клетки нуждаются в образовании основных макромолекул для высокой пролиферации и роста. Стоит отметить, что в процессе гликолиза синтезируются данные мономеры, принимающие участие в биосинтезе нуклеиновых кислот, белков и липидов [72]. Второе, при активном гликолизе снижается генерация свободных радикалов, что способствует сокращению возможности генотоксических нарушений клетки, а также помогает опухолевым клеткам уйти от апоптоза [4, 73-76]. Третье, образуемый при субстратном фосфорилировании лактата, может быть вытеснен из клетки в межклеточное пространство [77]. Установлено, что низкие значения рН окружающей среды благоприятны для опухолевой прогрессии и метастазирования. Более того, избыточное колличество АТФ нежелательно для опухоли, так как ингибирует активность протекания реакций гликолиза [78].

В современных исследованиях метаболизм опухолевых клеток описывается, как баланс гликолиза и окислительного фосфорилирования.

Теория «чистого гликолиза», на сегодняшний день, считается устаревшей и больше не поддерживается [3]. При снижении уровня кислорода было продемонстрированно, что опухолевые клетки не могут существовать, используя для синтеза АТФ только реакции гликолиза [79]. Для большого количества глиом, гепатом и клеточных линий рака молочной железы характерно преобладание реакций окислительного фосфорилирования для синтеза АТФ (однако, данный баланс смещается в сторону гликолитического метаболизма в условиях сниженной оксигенации). Максимальное количество энергии, получаемой через гликолиз опухолевой клеткой может составлять около половины всего синтезируемого АТФ. Однако, иногда в опухолевых клетках интенсивность окислительного фосфорилирования выше даже по сравнению с соседними клетками стромы [11, 70, 74, 80]. Также, опухолевые клетки могут обладать способностью обратимого переключения реакций энергетического метаболизма между гликолизом И окислительным фосфорилированием, данное переключение может зависеть от количества глюкозы в среде [70, 80]. В целом реальные опухоли пациента представляют собой высокогетерогенные образования, и метаболический статус различных клеток в составе опухолевого узла отличается [74, 81].

Следовательно, энергетический статус опухоли является мультипараметрической системой, способствующей их адаптации к изменяющемся условиям окружающей среды [70, 82-84].

## 1.3. Оптический метаболический имиджинг

## 1.3.1 Редокс-отношение на основе интенсивности флуоресценции метаболических кофакторов НАДН и ФАД

Метаболические кофакторы НАДН и ФАД обладают исключительной особенностью транспортировать протоны И электроны В реакциях метаболизма, энергетического поэтому интенсивностей анализ ИХ флуоресценции дает информацию о метаболическом профиле различных живых клеток и тканей [85]. Отношение электронных переносчиков в

окисленной к восстановленной форме называется редокс-отношением (redox ratio) [86]. Этот подход впервые предложил Briton Chance с коллегами [8, 73]. Ha сегодняшний существует множество день широко используемых математических формул для редокс-отношения: ФАД/(НАДН+ФАД) [87-90], ФАД/НАДН [13, 91-93] и НАДН/ФАД [94-96]. Соотношение интенсивностей флуоресценции, объект исследования и методы регистрации сигнала кофакторов являются определяющими в расчете данного показателя [96, 97].

Благодаря тому, что кофактор НАДН, главным образом, синтезируется в результате реакций гликолиза, а ФАД – в процессе окислительного фосфорилирования [36], сниженное значение редокс-отношения (ФАД/НАДН) интенсивном метаболизме клетки И смещении баланса говорит 0 энергетического метаболизма в сторону гликолиза. Кроме интенсивного В опухолевых клетках также выражены процессы гликолиза, цикла трикарбоновых кислот [98]. Если в клетке активно протекает гликолиз, а также цикл трикарбоновых кислот, в отличии от окислительного фосфорилирования, то это способствует обновлению пула кофактора НАДН. [99, 100].

Повышенное редокс-отношение ФАД/НАДН является индикатором смещения метаболической активности клетки в сторону окислительного фосфорилирования [22, 53]. Если в соматической клетке регистрируется редокс-отношения ФАД/НАДН при нормальных условиях, это может говорить о повышенной необходимости в образовании АТФ [101]. Данное изменение редокс-отношения происходит в связи с окислением кофактора НАДН до НАД<sup>+</sup> в результате реакций окислительного фосфорилирования. При гипоксии в условиях нехватки кислорода процесс окислительного фосфорилирования становится неосуществимым, что приводит к росту концентрации НАДН [36]. Недостаток окисления кофактора НАДН через дыхательную цепь митохондрии и рост его концентрации, благодаря реакциям гликолиза, увеличивает интенсивность флуоресценции НАДН в клетке в условиях сниженной оксигенации [7, 8, 73].

Для регистрации интенсивности флуоресценции метаболических кофакторов НАДН и ФАД применяются методы оптического метаболического имиджинга с однофотонным и двухфотонным режимами возбуждения [73, 90].

Исследование энергетического метаболизма с помощью двухфотонного режима возбуждения обладает значительным количеством возможностей, если сравнивать его с однофотонным режимом. Молекула флуорофора, при двухфотонном возбуждении, поглощает два фотона с низкой энергией во время одного квантового события. Благодаря этому, возбуждать флуоресценцию кофакторов НАДН и ФАД возможно в инфракрасной области (НАДН на длине волны 750 нм и ФАД - на 900 нм) [102], а не в ультрафиолете и ближнемультрафиолете [5, 73]. При возбуждении флуоресценции в инфракрасной области увеличивается светопропускание ткани, что крайне важно для in vivo исследований [103]. Благодаря тому, что одновременное поглощение сразу двух фотонов имеет вероятностный характер, эффективно двухфотонное возбуждение осуществляется исключительно в фокальной плоскости, где плотность фотонов является наивысшей. Такое прецессионное возбуждение флуоресценции исключает вероятность повреждения и фотообесцвечивания образца в процессе съемки [73].

## 1.3.2. Флуоресцентный время-разрешенный имиджинг (FLIM)

FLIM) (Fluorescence Lifetime Imaging) — метод, позволяющий визуализировать и анализировать сложные события, происходящие в клетке, внутриклеточных органеллах и компонентах биологического образца на основе данных о времени жизни флуоресценции. Время жизни флуоресценции определяется как среднее время, в течение которого молекула флуорофора находится в возбужденном состоянии перед своим возвратом в исходное состояние с испусканием фотона.

Первый FLIM инструмент был описан еще в 1959 году и позволял производить точечные измерения времени жизни флуоресценции в образце. Первые двумерные FLIM изображения получили Ван и соавт. в 1989 году [104].

Первые FLIM изображения тканей человеческого тела были получены 10 лет спустя в 1998 году в Германии Б. Амаечи. Это были изображения зубов и зубных бляшек. В 2000 году был запущен первый клинический многофотонный томограф JenLab GmbH. На сегодняшний день микроскопы различных марок снабжены опцией FLIM.

FLIM техника по способу получения данных бывает двух типов:

1. В частотном представлении \_ измерения, основанные на модуляционном подходе (frequency domain measurements). Возбуждающее излучение модулируется по интенсивности с высокой частотой, а при регистрации флуоресценции регистрируется фазы еще И сдвиг флуоресцентного излучения относительно зондирующего (φω). Этот сдвиг определяется  $\omega$  — угловой частотой гармонически модулированного света. По этому сдвигу можно вычислить время жизни флуоресценции.

2. Во временном представлении — измерения основаны на импульсном подходе (time domain). Зондируют коротким импульсом и измеряют всю кинетику затухания флуоресценции. Аппроксимируя ее экспонентой измеряется время жизни флуоресценции [104].

Оба способа измерения обеспечивают эквивалентную информацию, но на практике используется FLIM во временном представлении.

Анализ метаболического статуса клеток методом флуоресцентного имиджинга с временным разрешением, основан на регистрации времени жизни флуоресценции автофлуоресцирующих кофакторов НАДН и ФАД. Времени жизни флуоресценции кофакторов способно изменяться в зависимости от того, в какой они форме: в случае НАДН – в свободной или связанной с белками, в случае ФАД – открытой или закрытой конформации [6, 16, 105]. Хотя существует значительное количество работ, в которых проведены исследования энергетического метаболизма клеток с помощью анализа редокс-отношения, данный подход не дает возможности спектрально разделить свободные и связанные с белками состояния кофакторов, потому что спектры эмиссии

данных состояний практически идентичны и имеют разницу только на 10 – 20 нм при ширине пика в 150 нм [5, 106].

Флуоресцентный время-разрешенный имиджинг позволяет перейти от измерений интенсивности флуоресценции метаболических кофакторов к регистрации их среднего времени, в течение которого молекула флуорофора находилась в возбужденном состоянии [107]. Сумма возбужденных молекул экспоненциально уменьшается из-за излучательных и безызлучательных переходов в основное состояние. Интенсивность флуоресценции связана со значением времени жизни следующим выражением:

$$I_t = I_0 \ e^{-t/\tau}$$

где  $I_t$  — интенсивность флуоресценции молекулы в момент времени t,  $I_0$ — интенсивность флуоресценции молекулы в начальный момент времени,  $\tau$  — время жизни флуоресценции молекулы [6].

Время жизни флуоресценции индивидуально для каждого флуорофора и в значительной степени зависит от его молекулярного окружения, но в известной степени не зависит от его концентрации. Благодаря этому, изображения, полученные с помощью методов FLIM, содержат в себе уникальную молекулярную информацию, биохимическую «карту» образца. [105]. Однако, важно отметить, что на изменение времени жизни флуоресценции могут воздействовать такие параметры, как: парциальное давление кислорода, температура, pH, внешнее электрическое поле и другие [9, 108].

В 1992 г Lakowicz с соавторами предложили использовать технологию FLIM для разделения свободного и связанного с белками состояний кофактора HAДH [109]. Авторы впервые зарегистрировали время жизни флуоресценции свободной формы HAДH в растворе – 0.4 нс и в комплексе с малатдегидрогеназой – 1 нс [110]. В 2014 году Blacker с соавторами предложили методику сепарации HAДH и HAДФH в живых клетках и тканях по времени жизни флуоресценции [46].

На сегодняшний день метод время-коррелированного счёта фотонов (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) является главным и наиболее востребованным подходом для регистрации времени жизни флуоресценции флуорофоров любой природы [6]. Время-коррелированный счет фотонов основан на детектировании одиночных фотонов периодического светового сигнала, а именно измерении времени их регистрации детектором и реконструкции формы сигнала по этим измерениям времен. Время затухания флуоресценции детектируется сразу же после облучения объекта исследования коротко-импульсным лазерным излучением (фемто- или пикосекундным). фотон детектируется, измеряется соответствующее время [105]. Когда фотоимпульса детектора. После регистрации большого количества фотонов, в памяти счетчика (электронной платы) строится гистограмма. То есть результатом измерений является распределение фотонов по времени после импульса, возбуждающего флуоресценцию. В случае классического временнокоррелированного счета фотонов, их распределение регистрируется как функция одного параметра-времени после возбуждающего импульса (рисунок 4) [6, 12, 111]. В связи с тем, что для данных измерений необходимо временное разрешение порядка нескольких десятков пикосекунд, FLIM системы оборудованы сверхчувствительными и высокоскоростными гибридными детекторами, которые способны детектировать даже единичные фотонные события [112, 113].



Рисунок 4. Принцип работы метода время-коррелированного счёта фотонов [6, 105].

Характерные времена жизни флуоресценции кофакторов в клетке составляют для НАДН порядка 0.3 нс и 2.0 нс, а для ФАД около 0.3 нс и 2.7 нс. Более короткие времена жизни флуоресценции соответствуют свободной форме НАДН, более длинные – связанному с белами НАДН [16, 52]. Для кофактора ФАД времена жизни флуоресценции определяются не свободной или связанной с белками формами, а геометрией расположения молекулы внутри ФАДзависимого ферментного комплекса. Применение терминов «свободная форма» и «связанная с белками форма» к кофактору ФАД, используется, зачастую, для упрощения. Установлено, что кофактор ФАД всегда ковалентно связан с ферментативным компексом и может находится в клетке в следующих конформациях: закрытой, когда ароматические кольца изоаллоксазина и аденина располагаются наиболее близко друг к друга; и «открытой», при которой два ароматических кольца находятся, наоборот, максимально далеко [51]. В тоже время, в открытой конформации флуоресценция реализовывается за счет ароматической группы изоаллоксазина и время жизни флуоресценции характерное ей порядка 2 – 3 нс, однако, времена жизни флуоресценции «закрытой» конформации значительно короче - около 0.1 – 0.3 нс, в связи с тушением флуоресценции изоаллоксазина аденином [13, 46, 106].

Свободная форма кофактора НАДН сосредоточена, в основном, в цитоплазме клетки и участвует в реакциях гликолиза, в то время как связанная с белками форма локализуется в митохондриях и играет важную роль в процесах окислительного фосфорилирования [114]. Изменение времени жизни флуоресценции связанной с белками формой НАДН зависит от типа белка, с которым связался кофактор и может варьировать в диапазоне от 1.7 нс до 2.9 нс [73, 93, 115].

Большое количество исследовательских работ последних десяти лет направлено изучение изменения времени жизни флуоресценции на метаболических кофакторов НАДН и ФАД при онкологических заболеваниях [116-120], тогда как важно отметить, что главными критериями при анализе метаболического статуса клетки время-разрешенным флуоресцентным имиджингом являются процентные вклад свободной и связанной с белками форм кофакторов, а также их отношения [13, 48, 73, 115].

В настоящее время флуоресцентный время-разрешенный имиджинг технически представлен как: микроскопии основе двухфотонного на возбуждения, макроимиджинга и спектроскопии. К томуже, на сегодняшний день, созданы современные приборы для двухфотонной флуоресцентной микроскопии с опцией FLIM, сертифицированные клинического использования, такие как DermaInspect и MPTflex, которые были выпущены нмецким производителем JenLab [121-123]. За последнее десятилетие FLIM на основе время-коррелированного счета фотонов совершил большой прогресс в биомедицинских исследованиях. В целом ряде работ показано, что данный метаболическим достаточно чувствителен к метод изменениям при канцерогенезе коррелирует стандартными биохимическими И co И молекулярными показателями метаболизма.

## 1.4. Клинические критерии ответа опухоли на химиотерапию

Химиотерапия является стандартным методом лечения опухолей различных локализаций, основанном на введении в организм пациента химиотерапевтических агентов [124]. На сегодняшний день существует несколько различных классов противоопухолевых препаратов, имеющих различный механизм действия, а именно:

1. Алкилирующие антинеопластические агенты – нацелены на повреждение молекулы ДНК;

2. Антиметаболиты – ингибируют ряд важных биохимических процессов необходимых для пролиферативной функции клетки, а также приводят к запуску апоптоза;

3. Антрациклиновые антибиотики – ингибируют синтез молекулы ДНК и нарушают проницаемость мембраны клетки;

4. Ингибиторы топоизомеразы – избирательно нарушают структуру молекулы ДНК и деления опухолевых клеток на разных этапах митоза;

5. Митотические ингибиторы - ингибируют митоз и деление клетки [125].

Основные современные химиотерапевтические агенты представлены в таблице 1.

Общее название	Класс препарата
Капецитабин	антиметаболиты
Циклофосфамид	алкилирующие агенты

Таблица 1. Основные современные химиотерапевтические агенты [125].

Паклитаксел	митотические ингибиторы
Доцетаксел	митотические ингибиторы
Гемцитабин	антиметаболиты
Пеметрексед	антиметаболиты
Винорелбин	митотические ингибиторы
Цисплатин, оксалиплатин	алкилирующие агенты
Метотрексат	антиметаболиты
Амифостин	антинеопластические агенты
Иринотекан	ингибиторы топоизомеразы

В клинических протоколах химиотерапии противоопухолевые агенты используются либо в комбинациях друг с другом, либо отдельно в качестве монопрепарата, до или после операции. Выбор режима лечения зависит от локализации новообразования, стадии заболевания и других особенностей клинической картины пациента [126]. В связи с этим химиотерапия бывает:

1. Монохимиотерапия – вид химиотерапии, при котором протокол лечения состоит из использования только одного химиотерапевтического агента;

2. Комбинированная химиотерапия – вид химиотерапии, при котором себя, протокол лечения может включать В как несколько видов противоопухолевых агентов с различными механизмами действия (минимизирует развитие лекарственной устойчивости опухолевых клеток), так и комбинация с другими видами противоопухолевой терапии (с лучевой, хирургической и т.д.);

3. Консолидационная (консолидирующая) химиотерапия – вид химиотерапии, который обычно проводится после ремиссии для предотвращения рецидивов;

4. Поддерживающая химиотерапия – вид химиотерапии, при котором после основного курса лечения проводится дополнительный со сниженными дозами химиопрепаратов. Данный вид химиотерапии дает возможность продлить терапевтический эффект и снизить вероятность рецидивов.

Неоадъювантная химиотерапия – химиотерапия, которая проводится до хирургического вмешательства в целях уменьшения объема опухоли.

6. Адъювантная химиотерапия – проводится после иссечения опухоли хирургическим путем для профилактики рецидивов [126].

Химиотерапия – это длительный процесс лечения, пациент может получать 1 – 2 (иногда и более) курсов, которые состоят из 4-6 циклов, каждый из которых занимает от 1 до 4 недель получения пациентом лечения и последующий перерыв [127].

В качестве традиционного метода оценки ответа опухоли в клинике выступает сравнение размера и/или объема опухоли до и после лечения. В начале 1980 годов Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала первые международные критерии оценки опухолевого ответа на химиотерапию [128, 129]. По рекомендациям ВОЗ проводились замеры опухоли до и после лечения путем двумерного изменения (регистрация самого длинного диаметра и самого длинного перпендикулярного диаметра для каждой опухоли) с помощью штангенциркуля или линейки [130].

В 2000 годах были опубликованы новые критерии оценки ответа солидных опухолей на лечение (response evaluation criteria in solid tumors – RECIST) [131]. Они включали в себя: определение размера опухолевого очага (минимальный размер опухоли, который можно измерить стандартными методами  $\geq 20$  мм; спиральной компьютерной томографией  $\geq 10$  мм); фиксирования количества поражений (до 10 новообразований; не больше 5 в одном органе); использование одномерной системы измерения опухолевого размера. Новый критерий был более строгий, чем рекомендации ВОЗ [130, 132, 133].

Затем, в 2009 году были опубликованы обновленные критерии для оценки ответа солидных опухолей на лечение RECIST 1.1. Пересмотренное руководство было сфокусировано на морфологических характеристиках опухоли и включало в себя: фиксирование количества поражений (до 5 новообразований; не больше 2 в одном органе); характеристику опухолевого очага, измерение опухолевого очага по наибольшему диаметру (аксиальная реконструкция), включение в измерение зоны, приближенной к опухоли, оценку морфологии лимфатических узлов, измерение лимфатических узлов по наименьшему диаметру, применение позитронно-эмиссионной томографии с 18F-фтордезоксиглюкозой. Если целевой опухолевый очаг разделяется на определенное количество более мелких, его размер определяется, как сумма наибольших диаметров каждого образования. Если очаг очень маленький, его размер принимается за 5 мм. За полный ответ принимается исчезновение всех целевых опухолевых очагов и снижение размеров всех патологических лимфатических узлов на ≥ 10 мм в абсолютных значениях; частичный ответ – снижение размеров опухолевого очага на  $\geq 30\%$ ; прогрессирование заболевания – увеличение размера опухоли на  $\geq 20\%$  или абсолютный рост опухоли на 5 мм и более, а также появление нового опухолевого очага [134-136].

RECIST 1.1 широко применяется для верификации терапевтического противоопухолевого эффекта в клинике. Однако, для большинства опухолей проведение позитронно-эмиссионной томографии с 18F-фтордезоксиглюкозой

рекомендуется только через 4-6 недель после последнего цикла химиотерапии, хотя наиболее ранние изменения размеров опухоли могут регистрироваться уже через 4 недели после начала лечения [137, 138].

Оценка раннего ответа на лечение является нерешенной проблемой. Так как химиотерапия имеет ряд серьезных побочных эффектов, а именно: мукозит (воспаление слизистой пищеварительного тракта), алопеция (выпадение волос), тошнота и рвота, а также миелосупрессия (снижение производство клеток крови, и, следовательно, иммуносупрессия) возможность оценки раннего ответа опухоли на лечение с последующим изменением первоначального плана лечения, сменой препарата может существенно улучшить качество жизни больного и эффективность терапии [126, 139].

Ввиду неинвазивности (или минимальной инвазивности), высокой чувствительности, отсутствия необходимости введения дополнительных экзогенных химических красителей, оптический метаболический имиджинг на основе регистрации флуоресценции метаболических кофакторов НАДН и ФАД [140-142] может быть перспективным методом для исследования опухолевого ответа на лечение [143].

В последнее время измененный опухолевый метаболизм рассматривается, как потенциальная мишень для противоопухолевой терапии. Основные биохимические процессы, которые могут быть использованы в качестве таргета для новых препаратов является гликолиз, метаболизм глутамина и синтез жирных кислот. Считается, что разработка препаратов, направленных на изменение опухолевого метаболизма, может способствовать снижению негативного воздействия на нормальные клетки организма [144, 145].

Другим актуальным подходом для исследования энергетического метаболизма опухоли может быть его применение в противоопухолевой терапии. В настоящее время рассматривается комбинирование химиопрепаратов с блокаторами основных метаболических путей [146]. Например, WZB117 является ингибитором переносчика глюкозы GLUT1. В результате действия WZB117 уменьшается поглощение глюкозы, что приводит

Показан снижению скорости гликолиза И клеточного деления. К противоопухолевый эффект при комбинации WZB117 с цисплатином и паклитакселом [65]. Гексокиназа 2 - ключевым ферментом, участвующим в метаболизме глюкозы. Основными ингибиторами гексокиназы 2 являются 2дезоксиглюкоза (2-DG), 3-бромпируват (3-BrPA) и лонидамин (LND). Данные препараты находятся на ранних клинических и предклинических испытаниях [2, 65, 147]. Пируваткиназа катализирует последнюю стадию гликолиза, дефосфорилирование фосфоенолпирувата до пирувата. Пируват киназа является потенциальной мишенью для адъювантной терапии рака. Была показана улучшеная терапевтическая эффективность цисплатина в комбинации с блокатором пируваткиназы - shRNA, за счет увеличения апоптоза и ингибирования пролиферации [148].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## 2.1. Объекты исследования

Клеточные культуры. В работе были использованы следующие клеточные линии: опухолевые клетки рака шейки матки человека (HeLa Kyoto) и колоректальный рак мыши (CT26);

Модель опухолевого сфероида. Работа проводилась на опухолевых клетках линии Hela Kyoto в условиях 3D культивирования. Сфероиды были сформированы из 100 клеток на лунку. Визуализация осуществлялась с 5-го дня после посадки опухолевых клеток.

Лабораторные животные. Эксперименты выполнены на иммунодефицитных мышах-самках линии nu/nu, и мышах-самках линии Balb/C. Общее количество животных - 70. Мышей линии nu/nu и Balb/C получали из НПП "Питомник лабораторных животных" ФИБХ РАН (г. Пущино). Лабораторные животные содержались в условиях SPF-вивария с 12часовым световым ритмом.

*Опухолевые модели*. В работе использовались прививные опухолевые модели:

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

- 500 тыс опухолевых клеток CT26 суспендированных в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS), вводили подкожно на левое бедро мышей линии Balb/C.

Регистрацию размеров опухолей проводили 3 раза в неделю с помощью штангенциркуля. Опухолевый объем рассчитывали по формуле:

## V = a \* b \* 1/2b,

где *a* - длина опухолевого узла, а *b* - ширина опухолевого узла. Все эксперименты, проводимые на животных, осуществлялись согласно протоколам работы Этического Комитета Приволжского исследовательского медицинского университета (Нижний Новгород, Россия).

#### 2.2. Методики исследования

#### Культивирование линейных опухолевых клеток

Библиотечные клеточные культуры культивировали по стандартной методике в  $CO_2$  инкубаторе при 37<sup>0</sup> С в атмосфере 5%  $CO_2$ , с использованием питательной среды ДМЕМ (Панеко, Россия) с добавлением глутамина, пенициллина и стрептомицина, а также 10% бычьей эмбриональной сывороткой - FBS (HyClone, США). Клетки пересевали стандартным образом по достижению монослоя (три раза в неделю) с использованием растворов Версена (Панеко, Россия) и трипсина (Панеко, Россия).

## Культивирование опухолевых сфероидов

Опухолевые сфероиды формировали путем выращивания клеток HeLa Куоto в условиях 3D культивирования. Для адаптации после разморозки опухолевые клетки культивировались по стандартной методике до третьего пассажа. Затем клетки были посеяны на круглодонные планшеты с неадгезивным дном (Corning, Великобритания) в количестве 100 клеток на лунку.

#### Протоколы химиотерании

## 1. Протокол лечения цисплатином.

Для *in vitro* исследований монослойных клеточных культур был использован препарат цисплатин (Тева, Израиль) с концентрацией 2.6 µМ, что соответствует IC35. Для экспериментов с опухолевыми сфероидами применяли двойную концентрацию препарата, выбранную для клеточных монослойных культур, что соответствовало 5.2 µМ. Для *in vivo* экспериментов на мышах линии nu/nude с опухолями HeLa Kyoto была использована терапевтическая доза цисплатина 5 мг/кг массы тела, разведение осуществляли в 200 мкл PBS и препарат вводили внутрибрюшинно. Лечение начинали, когда опухоль достигала диаметра 0.5 см, что соответствовало ~ 6-7 дню опухолевого роста.

Всего было введено 11 доз в течение 4 недель. Для *in vivo* исследований на мышах линии Balb/C с опухолями CT26 была использована доза цисплатина 5 мг/кг массы тела, разведение осуществляли в 100 мкл PBS, препарат вводили внутрибрюшинно. Лечение начинали с первого дня опухолевого роста, три раза в неделю, всего было 9 доз в течение 3 недель.

2. Протокол лечения паклитакселом.

Для *in vitro* экспериментов на монослойных клеточных культурах HeLa Куоtо использовали паклитаксел (Bristol-Myers Squibb S.r.L., Италия) с концентрацией 3.2 нМ, что соответствовало IC50. Для исследований опухолевых сфероидов использовали двойную концентрацию препарата, выбранную для монослойных клеточных культур, 6.4 нМ. Для *in vivo* экспериментов на мышах линии Balb/C с опухолями CT26 использовали дозу паклитаксела 10 мг/кг массы тела, препарат разводили в 20 мкл PBS и вводили внутривенно. Лечение начинали с 5 дня опухолевого роста, раз в неделю, всего было 3 дозы в течение 3 недель.

3. Протокол лечения иринотеканом.

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

## Многофотонная флуоресцентная микроскопия и FLIM

Для регистрации интенсивности и времени жизни флуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в экспериментах на монослойных клеточных культурах *in vitro* использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) с FLIM приставкой SPC 150 TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Германия) и фемтосекундным лазером Mai Tai HP (Spectra-Physics, США). Изображения строились с помощью масляного-
иммерсионного объектива C-Apochromat W Korr (Carl Zeiss, Германия) с сорокакратным увеличением и числовой апертурой 1.3, что позволяло получить поле зрения 213\*213 микрон с разрешением 1024\*1024 пиксела. В качестве источника возбуждающего излучения был применен Ti:Sa короткоимпульсный фемтосекундный лазер с частотой следования импульсов порядка 80 МГц и длительностью 140 ± 20 фс. Для двухфотонного возбуждения флуоресценции НАД(Ф)Н использовали длину волны 750 HM, диапазон регистрации флуоресценции был 450 - 490 нм. Для двухфотонного возбуждения флуоресценции ФАД была выбрана длина волны 900 нм, принимали флуоресценцию в диапазоне 500 - 550 нм. Мощность возбуждающего излучения в обоих случаях была одинаковой и составляла 6 мВт. В ходе эксперимента параллельно снимался канал проходящего света ДЛЯ визуализации клеточной морфологии и, в дальнейшем, сопоставления ее с областью флуоресценции. Время регистрации флуоресценции при получении FLIM изображений было подобрано таким образом, чтобы количество фотонов в каждом пикселе анализируемой области составляло не менее 5000 и составило порядка 90 секунд. Для оптимизации условий наблюдения, во время эксперимента клетки находились в инкубаторе XLmulti S2 DARK (PeCon GmbH, Германия) при 37° C, 5% CO<sub>2</sub>. С целью увеличения точности измерения времени жизни флуоресценции и устранения негативного шумового вклада, эксперименты проводились в затемненном помещении с изолированными от внешнего освещения детекторами.

Для регистрации флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н и ФАД в экспериментах на опухолевых сфероидах *in vitro* и мышиных опухолях *in vivo* использовали многофотонный флуоресцентный томограф MPTflex (JenLab, Германия) с FLIM модулем SPC 150 TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Германия) и оптико-механической рукой для наиболее комфортной работы с животными. Изображения получали с помощью масляно-иммерсионного объектива EC Plan-Neofluar (Carl Zeiss, Германия) с сорокакратным увеличением и числовой апертурой 1.3, что позволило получить поле зрения 213\*213 микрон с разрешением 1024\*1024 пиксела. Флуоресценцию НАД(Ф)Н возбуждали на длине волны 750 нм, ФАД - 900 нм. Эмиссию регистрировали через широкополосный фильтр 409 – 660 нм, предустановленный в системе. Мощность возбуждающего излучения составляла 10 мВт для НАД(Ф)Н и 22 мВт для ФАД. Количество фотонов в пикселе составляло не менее 5000. С целью увеличения точности измерения времени жизни флуоресценции и устранения негативного шумового вклада, эксперименты проводились в затемненном помещении с изолированными от внешнего освещения детекторами. Сигнал второй гармоники от коллагена возбуждали на длине волны 750 нм и регистрировали в диапазоне 373 – 387 нм.

Анализ интенсивности флуоресценции кофакторов и их отношение  $\Phi A \square / H A \square (\Phi) H$  производили в программе ImageJ (National Institutes of Health, США). Изображения импортировали в программу, вычитали фон (за фон принимали изображения без объекта при тех же настройках), выделяли область цитоплазмы и количественно обсчитывали сигнал. Для количественной характеристики отношения интенсивностей сигналов  $\Phi A \square / H A \square (\Phi) H$ выбирались области с четко ко-локализованными сигналами в обоих каналах, области с артефактами не учитывались. Времена жизни флуоресценции кофактора НАД( $\Phi$ )H (t1, t2, tm) и относительные вклады короткой и длинной компонент затухания (a1 и a2, соответственно, где a1+a2=100%) оценивали в программе SPCImage (Becker & Hickl GmbH, Германия). Короткие времена жизни НАД(Ф)Н соответствуют его свободной (не связанной с белком) форме, длинные времена жизни флуоресценции – связанной с белками форме НАД(Ф)Н, соответственно. Изображение импортировали в программу, выбирали участки с допустимым хи-квадратом (от 0.8 до 1.2), выделяли область цитоплазмы клетки, исключая ядро.

#### Анализ пролиферативной активности in vitro

Для оценки пролиферативной активности клетки высевали в 12-луночные планшеты в количестве 1 × 10<sup>5</sup> клеток в 1 мл на лунку. Через 24 часа после

посева клеток к ним добавляли препарат (цисплатин или паклитаксел в зависимости от эксперимента) и инкубировали с препаратом в течение 6, 24 и 48 часов. Затем культуральную среду из каждой лунки собирали отдельно, клетки снимали 0,25% трипсином в ЭДТА, добавляли в соответствующие среды, центрифугировали при 1000 об / мин в течение 5 мин, разбавляли в 1 мл раствора Хэнкса (Панеко, Россия) и суспензировали. Далее 10 мкл клеточной суспензии смешивали с 10 мкл красителя трипанового синего. Общее количество клеток в суспензии и количество мертвых клеток (окрашивание трипановым синим) рассчитывали с использованием автоматического счетчика клеток TC20 (Bio-Rad, США). Данные были представлены как относительная пролиферация клеток (общее количество клеток, деленное на количество посеянных клеток).

#### Анализ жизнеспособности клеток in vitro

Для оценки жизнеспособности клеток в монослойных клеточных культурах и опухолевых сфероидах проводили окрашивание с помощью набора с Пропидиумом иодидом (PI) и Кальцеином (Thermo Fisher Scientific, Великобритания). Визуализацию красителей осуществляли на флуоресцентном микроскопе Leica DMIL (Leica, Германия) на увеличении 10х. Кальцеин окрашивает только живые клетки, для регистрации его сигнала использовали светофильтр YFP ET ( $\lambda_{Ex}$ : 500/20,  $\lambda_{Em}$ : 535/30). Пропидиум иодид проникает только в мертвые клетки, его флуоресценцию детектировали при помощи светофильтра TX2 green ( $\lambda_{Ex}$ : 560/40,  $\lambda_{Em}$ : 645/75). Для верификации клеточной морфологии получали изображения в проходящем свете.

#### Патоморфологический анализ

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

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

Для метаболического имиджинга НАД(Ф)Н и ФАД опухолевых сфероидов клетки HeLa Kyoto были помещены в лунку круглодонного планшета с неадгезивным дном в количестве 100 клеток на лунку. Для флуоресцентной визуализации зрелый 5-дневный сфероид переносились из планшета на чашки для конфокальной микроскопии со стеклянным дном (Ibidi, Германия) в среде DMEM life без фенолового красного (Gibco, США) в количестве 8 штук на чашку. Регистрацию флуоресценции кофакторов проводили через 2-3 ч после посадки сфероидов на чашки, когда сфероиды прикреплялись к стеклянному дну чашки. Схема эксперимента представлена на рисунке 5.



Рисунок 5. Методика метаболического имиджинга НАД(Ф)Н и ФАД опухолевых сфероидов.

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

Для формирования опухолей мышам подкожно вводили клетки HeLa Kyoto CT26. Непосредственно или перед экспериментом животное наркотизировали И над опухолью в стерильных условиях проводили препарирование кожного лоскута. Затем на опухоль ставили объектив от томографа **MPTflex** многофотонного флуоресцентного И проводили регистрацию сигнала НАД( $\Phi$ )Н. Схема эксперимента представлена на рисунке 6.



Рисунок 6. Методика in vivo метаболического имиджинга опухолей животных на основе флуоресцентной микроскопии НАД(Ф)Н с временным разрешением.

### Статистический анализ данных

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

#### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

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

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

В процессе воздействия цисплатина ΜЫ наблюдали снижение интенсивности флуоресценции НАД( $\Phi$ )Н и увеличение –  $\Phi$ АД, что привело к росту значения редокс – отношения  $\Phi A \square / H A \square (\Phi) H$  (рисунок 5). Начиная с 6 часов после добавления препарата было выявлено статистически значимое увеличение редокс – отношения  $\Phi A \square / H A \square (\Phi) H$  (от  $0.52 \pm 0.14$  до  $0.86 \pm 0.16$ , р = 0.000001). На временных точках 24 и 48 часов был обнаружен резкий скачек данного показателя (рисунок 7). Описанные выше изменения в показателе редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н при воздействии цисплатина обратно коррелировала с пролиферативной активностью данных клеток (r = -0.986): чем выше значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н, тем менее активно клетки делились (рисунок 7).

Также были проанализированы времена жизни флуоресценции НАД(Ф)Н. Было установлено, что в течение 6 часов воздействия цисплатина на клетки

НеLa значения времен жизни свободного и связанного НАД(Ф)Н не менялись и были ~ 0.44 нс для короткой компоненты (t1), и ~ 2.58 нс - для длинной компоненты (t2). Дальнейшее инкубрование клеток с препаратом привело к статистически незначимому увеличению времени жизни флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н до 0.48 нс и 2.71 нс для t1 и t2 соответственно (таблица 2).

Таблица 2. Время жизни флуоресценции кофактора НАД( $\Phi$ )Н в клетках HeLa до (0 часов) и в течение 48 часов после добавления цисплатина. Среднее ± SD, n = 75.

	0 часов	0.75 часов	3 часа	6 часов	24 часа	48 часов
$t_{1,}$ HC	$0.45 \pm 0.01$	$0.44 \pm 0.02$	$0.44\pm0.04$	$0.42 \pm 0.02$	$0.48 \pm 0.05$	$0.48 \pm 0.04$
$t_{2,}$ HC	$2.58 \pm 0.11$	$2.58 \pm 0.13$	$2.58\pm0.12$	2.51± 0.24	$2.71 \pm 0.14$	$2.72 \pm 0.11$

Значение процентного вклада свободной формы НАД( $\Phi$ )Н (a1) в процессе воздействия цисплатина на клетки снижалось, начиная с 6 часов после добавления препарата (с 80.02 ± 2.04% до 77.82 ± 1.69%, p = 0.00017) и до 66.34 ± 1.71% (p = 0.00001) на 24 часа (рисунок 7). Динамика изменения значения процентного вклада свободной формы НАД( $\Phi$ )Н прямо коррелировала с пролиферативной активностью клеток (r = 0.914): чем выше было значение процентного вклада свободной формы НАД( $\Phi$ )Н, тем более активно клетки делились (рисунок 7).

Α





Рисунок 7. Динамика изменения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н и времени жизни флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н в опухолевых клетках НеLа в процессе воздействия цисплатина. (А – изображения интенсивностей флуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД, редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н и вклада свободной формы НАД(Ф)Н; Б – гистограммы изменения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н и вклада свободной формы НАД(Ф)Н). Масштабная линейка 100 мкм. Среднее  $\pm$  SD, n = 75.

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

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

Исследование метаболических особенностей опухолевых клеток проводили на монослойной клеточной культуре HeLa Kyoto при химиотерапии паклитакселом в течение 24 часов в динамике. Для этого прицельно анализировали одни и те же клетки на протяжении всего эксперимента и регистрировали в них интенсивность флуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД и время жизни флуоресценции НАД(Ф)Н. На финальной точке данные клетки окрашивали на жизнеспособность. В качестве контроля использовали клетки без воздействия паклитакселом на той же временной точке.

В ходе исследования были выделены следующие популяции клеток: 1. живые, морфологически неизмененные клетки; 2. живые, морфологически измененные клетки; 3. мертвые клетки (клетки, окрашивающиеся, как мертвые пропидиум иодидом, на временной точке 24 часа). Анализ параметров флуоресценции метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД проводили только в живых клетках.

В контрольных клетках не наблюдалось изменения значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н в течение первых 6 часов, а затем снижалось с 0.95  $\pm 0.12$  до  $0.51 \pm 0.11$  (p = 0.00011) через 24 часа после начала эксперимента (рисунок 8). Тогда как во всех клетках, к которым добавляли паклитаксел, значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н постепенно увеличивались. Живые, морфологически неизмененные клетки демонстрировали наиболее выраженную динамику изменения значения редокс отношения  $\Phi A \Pi / H A \Pi (\Phi) H$ , чем две другие субпопуляции клеток в течение всего эксперимента  $(0.69 \pm 0.11)$  до  $1.15 \pm 0.15$ , р = 0.00017). В живых, морфологически измененных клетках наблюдался рост значения редокс – отношения  $\Phi A \Pi / H A \Pi (\Phi) H$  с 0.62 ± 0.15 до 1.01 ± 0.11 (p = 0.00021) при воздействии паклитакселом. В мертвых клетках было установлено увеличение значения редокс – отношения  $\Phi A \Pi / H A \Pi (\Phi) H c 0.67 \pm 0.03$  до 1.11 ± 0.21 (p = 0.00038). Важно отметить, что увеличение значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н в живых, морфологически измененных и мертвых клетках происходило, главным образом, из-за уменьшения интенсивности флуоресценции кофактора НАД( $\Phi$ )Н (рисунок 8), тогда как в живых, морфологически неизмененных клетках – роста из-за интенсивности флуоресценции кофактора ФАД (рисунок 8).

Α











Рисунок 8. Динамика изменения параметров флуоресценции метаболических кофакторов ФАД и НАД(Ф)Н в опухолевых клетках НеLa в процессе воздействия паклитаксела. (А – флуоресцентные и FLIM изображения кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД; Б – диаграммы изменения флуоресцентных параметров кофакторов ФАД и НАД(Ф)Н). Масштабная линейка 100 мкм. Среднее  $\pm$  SD, n = 30.

Также в динамике были проанализированы времена жизни флуоресценции кофактора НАД( $\Phi$ )Н в опухолевых клетках при химиотерапии паклитакселом. Установлено статистически значимое увеличение времени жизни связанной формы НАД( $\Phi$ ) с ~ 2.8 нс до ~ 3.2 нс (p = 0.00111) через 24 часа после добавления паклитаксела, как в живых, морфологически неизмененных, так и в морфологически измененных клетках (таблица 3).

Таблица 3. Время жизни флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н в клетках НеLa до (0 часов) и в течение 24-часового воздействия паклитакселом. Mean  $\pm$  SD, n = 25-50. (\*) - статистически значимое отличие от значения до добавления лекарственного средства (0 ч) и от контроля на той же временной точке,  $p \le 0,05$ .

		0 часов	0.75 часов	3 часа	6 часов	24 часа
	t1	0.53±0.04	0.52±0.03	0.52±0.02	0.52±0.03	0.50±0.02
контроль	t2	2.88±0.13	2.80±0.13	2.82±0.14	2.82±0.12	2.80±0.08
живые, морфологически	t1	0.53±0.07	0.50±0.03	0.50±0.02	0.50±0.07	$0.48{\pm}0.04$
неизмененные клетки	t2	2.86±0.08	2.83±0.08	2.90±0.11	2.99±0.09	3.22±0.35(*)
живые, морфологически	t1	0.53±0.06	0.55±0.03	0.51±0.05	0.50±0.05	0.51±0.06
измененные клетки	t2	2.89±0.10	2.87±0.11	2.90±0.11	3.07±0.21	3.17±0.29(*)
	t1	0.55±0.04	0.52±0.04	0.53±0.04	0.52±0.04	-
мертвые клегки	t2	3.00±0.13	2.83±0.08	2.77±0.34	2.94±0.11	-

Было выявлено снижение значения процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н во всех клетках после добавления паклитаксела (рисунок 8). Важно отметить, что характер изменения значения процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н связан с чувствительностью клеток к препарату. Наиболее ранние и выраженные изменения в значениях данного показателя были обнаружены в клетках, погибших через 24 часа после добавления препарата. Было показано снижение значения процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н уже через 0.75 часов после добавления паклитаксела к клеткам (рисунок 8). В погибающих клетках значения процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н снизились наиболее выраженно с 79.67  $\pm$  1.68 % до 72.96  $\pm$ 1.77 % (р = 0.00011) в течение 6 часов воздействия паклитаксела. В живых, морфологически измененных клетках значения процентного вклада свободной формы НАД( $\Phi$ )Н уменьшилось с 79.21 ± 0.71 % до 69.72 ± 3.11 % (p = 0.00121) через 24 часа после добавления паклитаксела. В живых, морфологически неизмененных клетках наблюдали снижение данного показателя с 79.23 ± 1.18 % до 74.19 ± 1.47 % (р = 0.00851) через 24 часа после добавления препарата. Стоит отметить, что наиболее ранние изменения наблюдались в клетках, погибших через 24 часа после добавления паклитаксела, тогда как наименее выраженные изменения в значении процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н субпопуляции морфологически были выявлены В живых, неизмененных клеток (рисунок 8).

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

### 3.2. Метаболический имиджинг опухолевых сфероидов HeLa Kyoto при химиотерапии

3.2.1. Метаболический имиджинг опухолевых сфероидов HeLa Kyoto при химиотерапии цисплатином

В ходе эксперимента осуществляли мониторинг флуоресцентных параметров метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в опухолевых сфероидах с 3 ч и до 48 ч после добавления препарата. В качестве контроля были использованы сфероиды без воздействия. Опухолевые сфероиды представляют собой гетерогенные образования, состоящие из клеток в различных пролиферативных и метаболических состояниях. Известно, что сфероиды с радиусами более 200 мкм имеют оболочку, состоящую из активно пролиферирующих клеток, и центр, состоящий из покоящихся клеток внутри (из-за сниженного доступа питательных веществ и кислорода) [149]. В связи с этим, анализ значений редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н и времен жизни флуоресценции НАД(Ф)Н проводили отдельно для клеток наружного и внутреннего слоев.

В ходе эксперимента было продемонстрированно, что в клетках внутреннего и наружного слоев контрольных сфероидов значений редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н статистически-значимо не различалось (рисунок 9). Однако, вклад свободной формы НАД(Ф)Н (a1) в клетках наружного и внутреннего слоя были различны. Активно пролиферирующей клетки наружного слоя имели более высокие значения вклада свободной формы НАД(Ф)Н, чем клетки внутреннего слоя на 6 и 7 дни роста (~ 79.01 против 74.12 %, p = 0.00014), что, вероятно, является следствием их более высокой скорости гликолитических реакций и согласуется с общим принципом метаболической организации опухолевых сфероидов. Никаких значительных изменений в параметрах флуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в клетках сфероидов с 5 по 7 день в процессе естественного роста не наблюдалось В результате действия цисплатина наблюдали рост значения редоксотношение ФАД/НАДН в опухолевых клетках леченых сфероидов уже через 3 часа после добавления препарата по сравнению с контрольными, нелечеными сфероидами (~ 0.36 против ~ 0.25, p = 0.00001) (рисунок 9). Данная закономерность наблюдалась как в клетках центральной зоны сфероида (внутренний слой), так и наружной (наружный слой). В течение 48 часов после добавления цисплатина значения редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н продолжало расти в клетках леченых сфероидов, по сравнению с контрольными нелечеными сфероидами и составляло, соответственно ~ 0.44 против ~ 0.33 (p = 0.00001) (рисунок 9).

Исследование времен жизни флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н не выявило статистически значимых различий между лечеными и контрольными сфероидами, и оно составляло ~ 0.45 нс для свободной формы НАД(Ф)Н и ~ 2.45 нс для связанной с белками формы НАД(Ф)Н (таблица 4).

Таблица 4. Время жизни флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н в клетках контрольных сфероидов и в течение 48-часового воздействия цисплатина. Меал  $\pm$  SEM, n = 3-4 сфероида. (\*) - статистически значимое отличие от значения контрольных сфероидов на той же временной точке,  $p \le 0.05$ .

			3 часа	6 часов	24 часа	48 часов
poJIb	внутренний слой	t <sub>1,</sub> нс	0.47±0.03	0.45±0.05	0.43±0.04	0.44±0.02
		t <sub>2,</sub> нс	2.45±0.15	2.41±0.17	2.46±0.09	2.41±0.19
ТНОХ	наружный слой	t <sub>1,</sub> нс	0.43±0.05	0.47±0.06	0.41±0.06	0.45±0.04
		t <sub>2,</sub> нс	2.41±0.13	2.49±0.12	2.44±0.12	2.47±0.18

атин	внутренний слой	t <sub>1,</sub> нс	0.52±0.05	0.53±0.05	$0.54{\pm}0.04$	0.48±0.05
		t <sub>2,</sub> HC	2.49±0.14	2.47±0.17	2.44±0.14	2.39±0.19
Циспл	наружный слой	t <sub>1,</sub> нс	0.53±0.05	0.52±0.04	0.51±0.03	0.49±0.05
		t <sub>2,</sub> нс	2.52±0.16	2.47±0.17	2.39±0.21	2.41±0.17

При исследовании процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н в опухолевых сфероидах при химиотерапии цисплатином было показано, что значения данного параметра в клетках наружного слоя росли спустя 3 часа после добавления препарата по сравнению с контролем (79.06 ± 0.31% против 75.25 ± 1.98%; p = 0.00011), а затем статистически значимо снижались спустя 24 часа воздействия химиопрепарата (72.41 ± 1.91% против 79.17 ± 0.81%; p = 0.00011) (рисунок 9). Тогда как в клетках внутреннего слоя сфероида значения процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н статистически значимо были выше по сравнению с контролем, начиная с 6 часов после воздействия препарата (76.57 ± 0.77% против 74.53 ± 0.78%; p = 0.00113) (рисунок 9). Спустя 48 часов после добавления цисплатина значения данного показателя достоверно снизились по сравнению с контролем (69.07 ± 2.45% против 74.01 ± 2.11%; p = 0.00011) (рисунок 9).







Наружный слой





Рисунок 9. Динамика изменения флуоресцентных показателей НАД( $\Phi$ )Н и  $\Phi$ АД в опухолевых сфероидах HeLa при химиотерапии цисплатином (A – флуоресцентные и FLIM изображения НАД( $\Phi$ )Н и  $\Phi$ АД; Б – гистограммы редокс-отношения  $\Phi$ АД/НАД( $\Phi$ )Н; В – гистограммы вклада свободной формы НАД( $\Phi$ )Н). Mean ± SEM, n = 3-4 сфероида. Масштабная линейка 30 мкм.

Таким образом, было установлено, что в пролиферирующих клетках наружного слоя вклад свободной формы НАД(Ф)Н выше, чем в покоящихся клетках внутреннего слоя, что говорит о метаболической гетерогенности сфероида. В результате исследования влияния цисплатина на флуоресцентные показатели метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в клетках опухолевого сфероида было выявлено, что значение редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н увеличивалось, а вклад свободной формы НАД(Ф)Н снижался в клетках наружного слоя сфероида в период 3-48 ч после лечения цисплатином.

### 3.2.2. Метаболический имиджинг опухолевых сфероидов HeLa Kyoto при химиотерапии паклитакселом

Исследование изменения метаболического статуса клеток опухолевого сфероида при химиотерапии паклитакселом проводили на опухолевых культурах линии HeLa Kyoto. Как и в случае с цисплатином, влияние паклитаксела на флуоресцентные показатели кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в клетках опухолевого сфероида оценивали отдельно для клеток внутреннего и наружного слоев. В обсчет брали только живые клетки. Оптический метаболический имиджинг проводили с 3 часов и до 48 часов после добавления паклитаксела.

Показано увеличение значения редокс – отношения  $\Phi A \square / H A \square (\Phi) H$ , начиная с 6-часовой временной точки после добавления паклитаксела в клетках всех слоев сфероида по сравнению с контролем (~ 0.55 против ~ 0.35 (p = 0.00011)) (рисунок 8). Значения редокс – отношения  $\Phi A \square / H A \square (\Phi) H$ продолжало расти до конца эксперимента (в течение 48 часов после добавления препарата) по сравнению с контролем и соответствовало ~ 0.75 против ~ 0.32 (p = 0.00001).

Анализ времен жизни флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н не выявило статистически значимых отличий и их значения соответствовали ~ 0.42 нс для

свободной формы НАД(Ф)Н и ~ 2.43 нс для связанной с белком формы НАД(Ф)Н (все значения представлены в таблице 5).

Таблица 5. Время жизни флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н в клетках контрольных сфероидов и в течение 48-часового воздействия паклитаксела. Mean  $\pm$  SEM, n = 3-4 сфероида. (\*) - статистически значимое отличие от значения контрольных сфероидов на той же временной точке,  $p \le 0.05$ .

			3 часа	6 часов	24 часа	48 часов
00JIb	внутренний слой	t <sub>1,</sub> нс	0.47±0.03	0.45±0.05	0.43±0.04	0.44±0.02
		t <sub>2,</sub> нс	2.45±0.15	2.41±0.17	2.46±0.09	2.41±0.19
THON	наружный слой	t <sub>1,</sub> нс	0.43±0.05	0.47±0.06	0.41±0.06	0.45±0.04
		t <sub>2,</sub> нс	2.41±0.13	2.49±0.12	2.44±0.12	2.47±0.18
гаксел	внутренний слой	t <sub>1,</sub> нс	0.52±0.07	0.55±0.07	0.54±0.05	0.49±0.09
		t <sub>2,</sub> нс	2.44±0.19	2.41±0.19	2.46±0.11	2.41±0.18
пакли	наружный слой	t <sub>1,</sub> нс	0.49±0.06	0.49±0.05	0.51±0.05	0.49±0.09
		t <sub>2,</sub> нс	2.42±0.19	2.41±0.23	2.39±0.28	2.42±0.22

Показано статистически значимое увеличение значения вклада свободной формы НАД( $\Phi$ )Н в клетках внутреннего слоя сфероида уже через 3 часа после добавления паклитаксела по сравнению с контролем (76.31 ± 0.51 против 74.93 ± 0.82, p = 0.00152). Тогда как в клетках наружного слоя опухолевого сфероида обнаружено статистически значимое снижение значения вклада свободной формы НАД( $\Phi$ )Н через 6 часов после добавления препарата по сравнению с контрольными нелечеными сфероидами (73.69 ± 1.75 против 80.25 ± 1.24, p = 0.00001) (рисунок 10).



Б

### Внутренний слой



Наружный слой





Рисунок 10. Динамика изменения флуоресцентных параметров метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в опухолевых сфероидах HeLa при химиотерапии паклитакселом (А – флуоресцентные изображения НАД(Ф)Н 63

В

и ФАД; Б – гистограммы редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н; Б – гистограммы вклада свободной формы НАД(Ф)Н (a1)). Mean ± SEM, n = 3-4 сфероида. Масштабная линейка 30 мкм.

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

### 3.3. In vivo флуоресцентная микроскопия с временным разрешением НАД(Ф)Н в мышиных опухолевых моделях при химиотерапии

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

Исследование влияния химиотерапии цисплатином на параметры флуоресценции кофактора НАД( $\Phi$ )Н опухолевых клеток *in vivo* проводили на мышах линии nu/nude с подкожно привитыми опухолями HeLa Kyoto. Регистрацию интенсивности флуоресценции и времени жизни кофактора осуществляли с помощью многофотонного НАД(Ф)Н флуоресцентного томографа MTPflex с подвижным оптическим трактом, что особенно удобно для прижизненного мониторинга. Поскольку флуоресценция ФАД в опухолях была очень слабая, это не позволило адекватно рассчитать редокс-отношение ФАД/НАД(Ф)Н. В связи с этим, основным показателем для оценки метаболического статуса опухолевых клеток в процессе лечения был анализ метаболического кофактора НАД(Φ)Н. времени жизни Регистрацию флуоресценции НАД( $\Phi$ )Н проводили на 35 день опухолевого роста.

В качестве верификации лечебного эффекта проводили замеры опухолевого роста и патоморфологический анализ. Было показано, что выбранная схема лечения приводит к торможению опухолевого роста во всех

леченых опухолях по сравнению с контрольными опухолями без воздействия (рисунок 11). Патоморфологическое исследование контрольных опухолей без лечения показало, что опухолевая ткань состояла из крупных полиморфных клеток с округлыми ИЛИ овальными крупными светлыми ядрами преимущественно с диффузным мелкодисперсным распределением хроматина и 1 -2 ядрышками. Цитоплазма клеток была слабобазофильна, клетки опухоли тесно прилегали друг к другу и образовывали комплексы, окруженные прослойками соединительной ткани. Митотическая активность в контрольных опухолях была умеренной. Встречались единичные клетки с признаками апоптоза. В некоторых комплексах опухоли узла наблюдаются единичные участки спонтанных некрозов (рисунок 11). Опухоли после химиотерапии цисплатином характеризовались обширными полями некрозов (от 70 до 90 %). Поля некроза локализовались в центре комплексов опухоли и были окружены тонкими полосами жизнеспособных опухолевых клеток. В ткани опухоли наблюдались клетки с вакуолизацией цитоплазмы, отеком и просветлением встречались немногочисленные клетки С признаками ядра, апоптоза. Митотическая активность была снижена. Вокруг опухоли отмечается выраженный воспалительный инфильтрат (рисунок 9). В целом опухоли после лечения цисплатином характеризовались сниженным количеством жизнеспособных клеток без морфологических изменений (таблица 6). Количественная оценка клеток с различными морфологическими признаками в леченых и контрольных опухолях представлена в таблице 6.

Таблица 6. Патоморфологическое исследование опухолей HeLa после химиотерапии цисплатином. Mean  $\pm$  SD, n = 5 опухолей (процент клеток с различными морфологическими признаками рассчитывали в 5 случайно выбранных поля зрения для каждой опухоли). (\*) - статистически значимое отличие от контроля, p  $\leq$  0.05.

	контроль	цисплатин
Общее число клеток в поле зрения, количество клеток	169.51±0.71	52.91±5.51 (*)
Общее число клеток без изменений, %	93.89±2.59	29.57±5.61 (*)
Общее число митозов, %	2.29±1.18	0.96±0.09 (*)
Общее число измененных клеток, %	6.11±2.59	70.43±5.61 (*)
Общее число клеток с дистрофическими изменениями, %	3.21±0.64	64.16±8.59 (*)
Общее число апоптозов, %	2.74±0.39	6.27±2.98 (*)

Анализ времена жизни флуоресценции свободной и связанной с белками форм НАД(Ф)Н не выявил статистически значимых отличий, времена жизни флуоресценции НАД(Ф)Н были одинаковыми как в леченых, так и контрольных опухолях без воздействия и составляли ~ 0.5 нс для свободной формы НАД(Ф)Н и ~ 2.5 нс для связанной с белками формы НАД(Ф)Н (таблица 7).

Таблица 7. Время жизни флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н в опухолевых клетках HeLa *in vivo* при химиотерапии цисплатином. Mean ± SEM, n = 5 опухолей (обсчет проводили по 50-75 клеткам в каждой опухоли).

	контроль	цисплатин
t1, нс	0.54±0.11	0.49±0.09
t2, нс	2.47±0.31	2.27±0.41

Однако, было продемонстрировано, что процентный вклад свободной формы НАД(Ф)Н статистически значимо снижался в опухолях после лечения цисплатином по сравнению с контрольными опухолями (71.22  $\pm$  3.86% против 79.48  $\pm$  2.87%, p = 0.00001) (рисунок 11).





Рисунок 11. *In vivo* флуоресцентная микроскопия НАД(Ф)Н опухоли НеLa *in vivo* при химиотерапии цисплатином. (А – автофлуоресценция НАД(Ф)Н (зеленый) и ГВГ коллагена (красный); процентный вклад свободной формы НАД(Ф)Н и патоморфологический анализ; Б – диаграмма опухолевого роста; В – диаграмма процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н). (\*) статистически значимое отличие от контрольных нелеченых опухолей, р $\leq$ 0.05, среднее значение ± SEM, n = 5 опухолей (обсчет проводили по 50-75 клеткам в

каждой опухоли). Масштабная линейка 50 мкм для флуоресцентных изображений и 60 мкм для патоморфологических.

Более низкое значение процентного вклада свободной формы НАД( $\Phi$ )Н в опухолях после лечения цисплатином, согласуются с данными, полученными в *in vitro* экспериментах, и могут указывать, на снижение гликолитической активности и смещении метаболического статуса в сторону митохондриального дыхания в опухолях после лечения.

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

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

Исследование изменения параметров времени жизни флуоресценции метаболического кофактора  $HAД(\Phi)H$  в опухолевых клетках при химиотерании препаратами с разным механизмом действия проводили на мышах линии Balb/C с подкожно привитыми опухолями СТ26. В качестве препаратов были выбраны: цисплатин, паклитаксел и иринотекан. Все три препарата используются В клинике и исследовательских работах для лечения колоректального рака. Регистрацию флуоресценции НАД( $\Phi$ )Н проводили на 7, 14 и 21 дни опухолевого роста. Наибольший интерес представлял 7 день, так как данное время соответствует раннему ответу опухоли на лечение. В качестве контроля были использованы опухоли на тот же день без лечения.

Анализ динамики роста опухоли СТ26 в течение 21 дня показал, что все препараты оказывали ингибирующее действие на опухоли в применяемых схемах лечения. На 7 день опухоли во всех леченых группах не отличалась по размеру от контрольных нелеченых опухолей. Тогда как статистически значимые различия в размерах леченых и нелеченых опухолей были зарегистрированы только на 14 и 21 день опухолевого роста. Было установлено, что препараты цисплатин и иринотекан ингибировали опухолевый рост более выраженно, чем паклитаксел (рисунок 12).

Патоморфологический анализ показал, ЧТО контрольные опухоли характеризовались плотной структурой и состояли из полиморфных клеток различного размера c крупными круглыми или овальными ядрами, диффузно распределенный содержащими хроматин И 1-2 ядрышки. Базофильная цитоплазма была сформирована в виде тонкого кольца вокруг ядра клетки. Опухоли имели высокую митотическую активность. На 7 день опухолевого роста встречались единичные некротические клетки, тогда как на 14 и 21 дни были обнаружены значительные участки спонтанного некроза (~ 25 % и ~ 60 % площади всей опухоли, соответственно) (рисунок 10). При исследовании патоморфологии леченых опухолей было выявлено, что на 7 день все опухоли в леченых группах не отличались по морфологии с контрольными нелечеными опухолями. Тогда как на 14 день, было показано, что во всех леченых опухолях, вне зависимости от вида препарата, наблюдались выраженные дистрофические изменения. Леченые опухоли характеризовались васкуляризацией цитоплазмы, отеками, сниженным количеством жизнеспособных опухолевых клеток. Кроме того, было обнаружено снижение митотической активности клеток и увеличение площадей некроза (~ 50%) площади всей опухоли). На 21 день поля некроза занимали ~ 70% площади всей опухолей в группах с лечением цисплатином и паклитакселом и ~ 90% - в группах с лечением иринотеканом (рисунок 12).

Α





Рисунок 12. Ответ опухоли СТ26 на химиотерапию цисплатином, паклитакселом и иринотеканом. (А – Гистограмма опухолевого роста; Б – Патоморфологический анализ). (\*) - статистически значимое отличие от нелеченых контрольных опухолей на тот же день, p $\leq$ 0.05, среднее значение ± SEM, n = 5 опухолей. Масштабная линейка 80 мкм.

Исследование времени жизни флуоресценции свободной и связанной с белком форм кофактора НАД(Ф)Н в леченых и контрольных опухолях не
выявило статистически значимых изменений и времена жизни составляли ~ 0.4 для свободной формы НАД(Ф)Н и ~ 2.3 нс для связанной с белками формы НАД(Ф)Н соответственно. Более детальная информация о временах жизни флуоресценции НАД(Ф)Н представлена в таблице 8.

Таблица 8. Время жизни флуоресценции кофактора НАД( $\Phi$ )Н в опухолевых клетках СТ26 *in vivo* при химиотерапии цисплатином, паклитакселом и иринотеканом. Mean  $\pm$  SEM, n = 5 опухолей (обсчет проводили по 50-75 клеткам в каждой опухоли).

		Время жизни флуоресценции НАД(Ф)Н			
		контроль	цисплатин	паклитаксел	иринотекан
7 день	t1 (нс)	$0.41 \pm 0.08$	$0.43 \pm 0.05$	$0.45 \pm 0.06$	$0.43 \pm 0.05$
	t2 (HC)	$2.27 \pm 0.19$	$2.22 \pm 0.18$	$2.23\pm0.29$	$2.27 \pm 0.14$
14 день	t1 (нс)	$0.45 \pm 0.21$	$0.54 \pm 0.05$	$0.51\pm0.09$	$0.52 \pm 0.06$
	t2 (нс)	$2.41 \pm 0.19$	$2.46 \pm 0.18$	$2.37\pm0.24$	$2.45 \pm 0.18$
21 день	t1 (нс)	$0.38\pm0.08$	$0.44 \pm 0.05$	$0.52\pm0.09$	$0.48 \pm 0.05$
	t2 (HC)	$2.26\pm0.17$	$2.32 \pm 0.13$	$2.45\pm0.23$	2.41 ± 0.15

Анализ среднего времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н (tm) показал статистически значимое увеличение данного параметра на 14 день опухолевого роста в опухолях леченых цисплатином  $(1.02 \pm 0.08$  нс против  $0.85 \pm 0.09$  нс (p = 0,00062)) и иринотеканом  $(1.01 \pm 0.09$  нс против  $0.85 \pm 0.09$  нс, p = 0,00011) и во всех леченых группах на 21 день по сравнению с контролем  $(0.92 \pm 0.08$  нс;  $0.98 \pm 0.05$  нс и  $0.97 \pm 0.08$  нс против  $0.71 \pm 0.13$  нс, p = 0,00011) (рисунок 10). Значения отношения процентных вкладов свободной к связанной с белками форм НАД(Ф)Н (a1 / a2) в ходе химиотерапии снижались, начиная с 7 дня во всех леченных группах по сравнению с контролем (3.89 ± 0.21 %; 3.76 ± 0.08 % и  $3.74 \pm 0.25$  % против  $4.65 \pm 0.56$  %, p = 0,00015) (рисунок 13). Снижение значений отношения a1/a2 НАД(Ф)Н продолжалось на 14 и 21 дни опухолевого роста во всех леченых группах по сравнению с контролем (рисунок 13).







Рисунок 13. In vivo флуоресцентная время-разрешенная микроскопия НАД( $\Phi$ )Н в опухоли СТ26 при химиотерапии цисплатином, паклитакселом и иринотеканом. (А – Изображения времени жизни флуоресценции НАД( $\Phi$ )Н; Б – Изображения процентного вклада свободной формы НАД( $\Phi$ )Н; В – диаграмма времени жизни флуоресценции НАД( $\Phi$ )Н; Г – диаграмма процентного вклада свободной формы НАД( $\Phi$ )Н). (\*) - статистически значимое отличие от нелеченых контрольных опухолей, р $\leq$ 0.05, среднее значение ± SEM, n = 5 опухолей (обсчет проводили по 50-75 клеткам в каждой опухоли). Масштабная линейка 80 мкм.

Важно отметить, что степень изменений значения отношения a1/a2  $HAД(\Phi)H$  коррелировала с выраженностью ответа опухоли на лечение - в опухолях, леченых паклитакселом, наблюдалось наименьшее торможение опухолевого роста, по сравнению с остальными лечеными группами, и a1/a2 в отношения НАД(Ф)Н были изменения значении наименее выраженными. Стоит отметить, что изменения в параметрах времени жизни  $HAД(\Phi)H,$ метаболического кофактора флуоресценции вызванные химиотерапией, обнаруживались до того, как лечебный эффект подтверждался стандартными методами (измерение скорости роста опухоли И патоморфологический анализ) (рисунок 12 и 13).

Таким образом, в результате исследования изменения времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н в опухоли in vivo при химиотерапии различными препаратами показано, что значение отношение a1/a2 НАД(Ф)Н снижалось во всех леченых опухолях уже на 7 день опухолевого роста. Характер изменения значения отношения a1/a2 НАД(Ф)Н не зависел от механизма действия препарата и был схож для цисплатина, паклитаксела и иринотекана.

Ранее основным объектом исследований с применением флуоресцентного время-разрешенного имиджинга НАД(Ф)Н были, в основном, монослойные клеточные культуры. Данный метод использовался для поиска различий между нормальными и опухолевыми клетками. Так, в работе [19] с помощью FLIM- микроскопии на опухолевых клетках рака молочной железы (Hs578T) и нормальных клетках молочной железы (Hs578Bst) были количественного определены концентрации и конформации кофактора НАДН. Средняя концентрация НАДН в опухолевых клетках была в 1,8 раза выше, чем в нормальных клетках молочной железы. Показаны различные времена жизни флуоресценции НАДН в эпителиальных клетках (HEK293T), опухолевых клетках (HeLa) и первичных культурах гепатоцитов мыши [18]. В работе [16] было проведено сравнение параметра среднего времени жизни НАД(Ф)Н для клеток плоскоклеточной карциномы (SCC-25 и SCC-4) и нормальных клеток слизистой оболочки полости рта (OKF6/TERT-2).

In vivo FLIM анализ энергетического метаболизма опухолевых клеток выполнялся только в единичных работах. Например, в исследовании [15] показана возможность анализа времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н в процессе канцерогенеза, химически индуцированного на слизистой ткани щеки хомяка. Однако, надо отметить, что данная модель редко используется в экспериментальных исследованиях ввиду ее сложности, низкого выхода новообразований у животных, а также невозможности стандартизации (разная скорость образования опухолей и их роста).

В нашей работе мы разработали методики FLIM-микроскопии для различных, наиболее часто используемых моделей: монослойных клеточных сфероидов опухолей мышей культур, подкожных И И впервые продемонстрировали возможности FLIM-микроскопии В исследованиях энергетического метаболизма опухолевых клеток как in vitro, так и in vivo. Исследование флуоресцентных параметров кофактора НАД(Ф)Н для живых опухолевых сфероидов и подкожных мышиных опухолей in vivo было проведено нами впервые.

В нашем исследовании впервые было установлено, что параметры флуоресценции метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД чувствительны к ответу опухолевых клеток на химиотерапию препаратами с различным механизмом действия и могут быть использованы в качестве критерия ответа

опухоли на лечение. Для всех экспериментов in vitro на монослойных клеточных культурах и опухолевых сфероидах вне зависимости от препарата было показано увеличение редокс – отношения ФАД/НАД(Ф)Н после химиотерапии. Также во всех экспериментах in vitro на монослойных клеточных культурах, опухолевых сфероидах и in vivo на мышиных опухолевых моделях было выявлено снижение процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н. Полученные изменения были характерны для трех препаратов с различным механизмом действия – цисплатина (вызывает химическое повреждение оснований ДНК), паклитаксела (вызывает реорганизацию микротрубочек) и иринотекана (ингибирует топоизомеразу I). Эти результаты говорят об изменении энергетического метаболизма в опухолевых клетках после химиотерапии и согласуются с работами других авторов. Так в работе [21] показано снижение интенсивности гликолиза при лечении культуры плоскоклеточного рака головы и шеи in vitro цисплатином. Было выявлено снижение процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н, что коррелировало с уменьшением продукции лактата, потребления глюкозы и пролиферативной активности клеток, что, косвенно, согласуется с нашими результатами. Также на культуре плоскоклеточного рака головы и шеи in vitro и *in vivo* обнаружено снижение продукции лактата при воздействии цисплатином [150]. Данный эффект был связан со снижением интенсивности реакций гликолиза в опухолевых клетках в результате окислительного стресса, что также согласуется с нашими данными. На культурах рака шейки матки и молочной железы in vitro и in vivo продемонстрированно снижение уровня гликолитической активности в клетках после лечения цисплатином, что приводило к ингибированию опухолевого роста и клеточной пролиферации [151]. Мы также можем говорить, что изменение метаболического статуса опухолевых клеток в сторону окислительного фосфорилирования после химиотерапии коррелировало со снижением пролиферативной активности опухолевых клеток. In vitro на клеточных линиях рака шейки матки и рака мочевого пузыря установлено статистически значимое снижение поглощения

глюкозы клетками после химиотерапии цисплатином и паклитакселом [152], что согласуется с результатами, показанными в нашей работе. На культуре клеток меланомы продемонстрированно влияние паклитаксела на регуляцию уровня гликолиза в клетках - снижает уровень глюкозо-1,6-бисфосфата и фруктозо-1,6-дисфосфата, что приводит к ингибированию интенсивности гликолиза [153]. На клетках нейробластомы человека *in vitro* был обнаружен прямой митохондриальный эффект паклитаксела - увеличение интенсивности клеточного дыхания и рост синтеза активных форм кислорода [154]. Обнаружено увеличение содержания АТФ и снижения содержание глюкозы (18F-ФДГ) в клетках колоректального рака после воздействия иринотеканом [155]. Также на культурах клеток колоректального рака показано увеличение образования АТФ после воздействия иринотеканом, что способствовало запуску апоптоза в клетках и снижению их жизнеспособности [156].

Однако, существуют работы, где показана обратная реакция опухолевых клеток на химиотерапию. Так в *in vivo* исследованиях на модельных опухолях головы И шеи (FaDu) было обнаружено снижение времени жизни флуоресценции НАД( $\Phi$ )Н и рост процентного вклада свободного НАД( $\Phi$ )Н в опухолях спустя 48 часов после лечения цисплатином, что может свидетельствовать об увеличении активности реакций гликолиза [85]. В *in vitro* исследовании на первичных линиях плоскоклеточных раков было показано увеличение поглощения глюкозы после химиотерапии цисплатином с первого по шестой день лечения [157]. В работе [158] на клеточных линиях колоректального рака (НТ29 и НСТ116), гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2) и аденокарциномы протоков молочной железы (MCF-7) выявлено снижение дыхательной активности клеток через 5-6 часов после добавления цисплатина и увеличение интенсивности гликолиза через 8-9 часов после лечения. Эти отличия, вероятно, связаны с особенностями опухолевых линий, а также регистрацией времени жизни флуоресценции  $HAJ(\Phi)H$  на более ранних временных точках, где, вероятно, качественное воздействие химиопрепарата на опухолевые клетки еще не было запущенно. Стоит отметить, что во многих

работах для идентификации метаболических нарушений использовались стандартные биохимические методы с добавлением красителей и верифицирующих агентов.

Важно подчеркнуть, что в нашей работе было комплексно проведено исследование влияния трех препаратов с различным механизмом действия: цисплатин, паклитаксел и иринотекан на метаболизм клеток в моделях монослойных клеточных культур, опухолевых сфероидов и мышиных опухолевых моделях. Поскольку все результаты имели однонаправленный тренд, мы можем говорить об универсальности механизма переключения клеточного метаболизма в ответ на химиотерапию.

В данной работе на монослойных клеточных культурах и опухолевых сфероидах HeLa Kyoto впервые выявлен гетерогенный ответ опухоли на воздействие паклитакселом. В монослойных клеточных культурах был проведен мониторинг судьбы одних и тех же клеток и показано, что клеточная популяция делилась на живые, морфологически неизмененные клетки; живые, морфологически измененные клетки и погибающие клетки. В каждой субпопуляции опухолевых клеток параметры флуоресценции метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД изменялись с различной скоростью и динамикой. В живых опухолевых сфероидах впервые с помощью FLIM-микроскопии было показано, что клетки наружного и внутреннего слоев реагировали на лечение по-разному. На сегодняшний день установлено, что многие культивируемые клеточные линии, включая HeLa, являются изначально высоко-гетерогенными по генотипическим и фенотипическим характеристикам [159]. В работе [14] показано, что химиочувствительная клеточная линия рака поджелудочной железы включает в себя субпопуляцию клеток с высокой степенью устойчивости, тогда как резистентные линии опухолевых клеток содержали субпопуляции резистентные к химиопрепаратам. К тому же на опухолевых сфероидах и ксенографтах рака груди человека была продемонстрирована значительная гетерогенность ответа при лечении паклитакселом. Авторы предполагают, что это может быть связано с различной чувствительностью

клеток к паклитакселу, а также наличием субпопуляции, нечувствительной к данному препарату [143]. В исследовании [160] авторы установили, что клетки, находящиеся в состоянии покоя (внутренний слой сфероида), являются более резистентными к паклитакселу, по сравнению с активно пролиферирующими клетками (наружный слой сфероида). В нашем исследовании мы также обнаружили гетерогенный ответ опухоли на лечение и провели детальный анализ изменений параметров флуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД в каждой субпопуляции клеток отдельно.

Впервые нами была обнаружена корреляция между изменениями флуоресцентных параметров метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД и пролиферативной активностью клеток в динамике. Было показано, что чем активнее делятся клетки, тем ниже значения редокс-отношения  $\Phi A \Pi / H A \Pi (\Phi) H$ и выше значения вклада свободной формы НАД(Ф)Н– метаболизм смещен в сторону гликолитического. Интенсивный гликолиз признан характерной чертой активно-пролиферирующих опухолевых клеток [161]. На клетках линии карциномы легкого H1299 in vivo продемонстрирована связь интенсивного гликолиза и активной пролиферации в опухоли *in vivo*. Также было показано, опухолевые клетки экспрессируют исключительно эмбриональную что изоформу пируваткиназы M2 [162]. Доказано, что высоко пролиферирующие клетки глиобластомы SF188 in vitro активно потребляют глюкозу и используют реакции гликолиза для образования АТФ (~90% глюкозы идет на образование лактата и аланина) [163]. Эти результаты хорошо согласуются с нашими данными и подтверждают общепринятую закономерность об интенсивном гликолизе при высокой пролиферативной активности раковых клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые было проведено комплексное исследование энергетического метаболизма с использованием флуоресцентной микроскопии с временным разрешением в различных опухолевых моделях, а именно в монослойных клеточных культурах, сфероидах и опухолях животных *in vivo*.

Оценка изменения флуоресцентных параметров метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в процессе химиотерапии в монослойных клеточных культурах показала увеличение редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н и снижение вклада свободной формы НАД(Ф)Н, что может быть связано со смещением метаболической активности опухолевых клеток В сторону митохондриального под влиянием препаратов. дыхания химических Прицельный мониторинг одних и тех же клеток показал, что опухолевые одной клеточной клетки линии имеют разную чувствительность к химиопрепаратам. Степень ответа опухолевых клеток на химиотерапию была c интенсивностью изменения флуоресцентных параметров связана метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД опухолевых клеток.

При помощи оригинальной методики визуализации метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в живых клетках опухолевого сфероида было выявлено, что сфероид метаболически-гетерогенен: клетки наружного слоя имели более высокие значения вклада свободной формы НАД(Ф)Н, что может говорить о смещении метаболического статуса в сторону гликолиза, по сравнению с клетками внутреннего слоя, которым было характерно смещение в сторону митохондриального дыхания. Стоит отметить, что именно клетки наружного слоя опухолевого сфероида, с более выраженным гликолитическим метаболизмом и активной пролиферацией, были наиболее восприимчивы к химиотерапии и переключали свой метаболизм в сторону митохондриального дыхание в процессе химиотерапии.

С использованием оригинальной методики *in vivo* метаболического имиджинга опухолей животных на основе флуоресцентной микроскопии с временным разрешением НАД(Ф)Н было продемонстрировано снижение 84 процентного вклада свободной формы НАД(Ф)Н. Полученные данные могут свидетельствовать об увеличении интенсивности митохондриального дыхания в леченых опухолях. В результате работы показана применимость анализа параметров флуоресценции НАД(Ф)Н для определения раннего опухолевого ответа на лечение, до того, как они отразятся на росте и морфологии опухоли.

Результаты работы показали возможность прижизненного исследования метаболического статуса опухолевых клеток при химиотерапии в динамике на микроскопическом уровне. Полученные результаты расширяют понимание действия механизмов ответа опухоли на лечение И механизмов химиопрепаратов, что важно для поиска новых противоопухолевых мишеней и способов мониторинга эффективности терапии. Прикладным аспектом нашей работы перспективе, разработка является, В методов скрининга химиопрепаратов на выделенных опухолевых клетках пациентов для перехода персонализированной медицине. Более того, полученные В к нашем быть разработки исследовании методики могут использованы ДЛЯ эндоскопических FLIM систем с целью оценки раннего ответа опухоли на лечение в клинике.

## выводы

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

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

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

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

5. На мышиных опухолевых моделях HeLa и CT26 проведена прижизненная визуализация метаболического статуса на клеточном уровне.

Установлено, что при лечении химиопрепаратами с различными механизмами действия вклад свободной формы НАД(Ф)Н в опухоли СТ26 снижается по сравнению с контролем (р ≤ 0.00115), начиная с 7 дня роста, до морфологических и ростовых проявлений ответа опухоли на лечение.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Warburg, O. The Metabolism of Tumors in the Body / O. Warburg, F. Wind,
 E. Negelein // J Gen Physiol. – 1927. – Vol. 8, N. 6. – P. 519-30.

Pelicano, H. Glycolysis inhibition for anticancer treatment / H. Pelicano, D.S.
 Martin, R.H. Xu, P. Huang // Oncogene. – 2006. – Vol. 25, N. 34. – P. 4633-46.

3. Lopez-Lazaro, M. The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? / M. Lopez-Lazaro // Anticancer Agents Med Chem. – 2008. – Vol. 8, N. 3. – P. 305-12.

Cairns, R. A. Regulation of cancer cell metabolism / R.A. Cairns, I.S. Harris,
T.W. Mak // Nat Rev Cancer. – 2011. – Vol. 11, N. 2. – P. 85-95.

5. Chorvat, D. Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues / D. Chorvat, A. Chorvatova // Laser Physics Letters. – 2009. – Vol. 6, N. 3. – P. 175-193.

6. Becker, W. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting / W. Becker, A. Bergmann, M.A. Hink, K. Konig, K. Benndorf, C. Biskup // Microsc Res Tech. – 2004. – Vol. 63, N. 1. – P. 58-66.

 Chance, B. Optical method / B. Chance // Annu Rev Biophys Biophys Chem. – 1991. – Vol. 20. – P. 1-28.

 Chance, B. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals / B. Chance, B. Schoener, R. Oshino, F. Itshak, Y. Nakase // J Biol Chem. – 1979. – Vol. 254, N. 11. – P. 4764-71.
 Lakowicz, J. R. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH / J.R. Lakowicz, H. Szmacinski, K. Nowaczyk, M.L. Johnson // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1992. – Vol. 89, N. 4. – P. 1271-1275.

 McMillan, P. J. The human malaria parasite Plasmodium falciparum possesses two distinct dihydrolipoamide dehydrogenases / P.J. McMillan, L.M. Stimmler, B.J. Foth, G.I. McFadden, S. Muller // Mol Microbiol. – 2005. – Vol. 55, N. 1. – P. 27-38.
 Fogal, V. Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation / V. Fogal, A.D. Richardson, P.P. Karmali, I.E. Scheffler, J.W. Smith, E. Ruoslahti // Mol Cell Biol. – 2010. – Vol. 30, N. 6. – P. 1303-18.

Becker, W. Fluorescence lifetime imaging--techniques and applications / W.
 Becker // J Microsc. - 2012. - Vol. 247, N. 2. - P. 119-36.

Druzhkova, I. N. The metabolic interaction of cancer cells and fibroblasts - coupling between NAD(P)H and FAD, intracellular pH and hydrogen peroxide / I.N.
 Druzhkova, M.V. Shirmanova, M.M. Lukina, V.V. Dudenkova, N.M. Mishina, E.V.
 Zagaynova // Cell Cycle. – 2016. – Vol. 15, N. 9. – P. 1257-66.

14. Mora-Rodriguez, R. Characterization of heterogeneous response to chemotherapy by perturbation-based modeling of fluorescent sphingolipid metabolism in cancer cell subpopulations / R. Mora-Rodriguez, J. Molina-Mora // 2016 IEEE 36th Central American and Panama Convention. 2016. – Vol. P. 1-7.

15. Skala, M.C. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia / M.C. Skala, K.M. Riching, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K.W. Eliceiri, J.G. White, N. Ramanujam // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – Vol. 104, N. 49. – P. 19494-9.

Ruck, A. Spectrally resolved fluorescence lifetime imaging to investigate cell metabolism in malignant and nonmalignant oral mucosa cells / A. Ruck, C. Hauser, S. Mosch, S. Kalinina // J Biomed Opt. – 2014. – Vol. 19, N. 9. – P. 96005.

17. Blacker, T.S. Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM / T.S. Blacker, Z.F. Mann, J.E. Gale, M. Ziegler, A.J. Bain, G. Szabadkai, M.R. Duchen // Nat Commun. – 2014. – Vol. 5. – P. 3936.

Ramanujan, V.K. Multiphoton fluorescence lifetime contrast in deep tissue imaging: prospects in redox imaging and disease diagnosis / V.K. Ramanujan, J.H. Zhang, E. Biener, B. Herman // J Biomed Opt. – 2005. – Vol. 10, N. 5. – P. 051407.

19. Yu, Q. Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level / Q. Yu, A.A. Heikal // J Photochem Photobiol B. -2009. - Vol. 95, N. 1. - P. 46-57.

20. Drozdowicz-Tomsia, K. Multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy reveals free-to-bound NADH ratio changes associated with metabolic inhibition / K. Drozdowicz-Tomsia, A. Anwer, M. Cahill, K. Madlum, A. Maki, M. Baker, E. Goldys // Journal of biomedical optics. – 2014. – Vol. 19. – P. 86016.

Shah, A. T. Optical metabolic imaging of treatment response in human head and neck squamous cell carcinoma / A.T. Shah, M. Demory Beckler, A.J. Walsh, W.P. Jones, P.R. Pohlmann, M.C. Skala // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, N. 3. – P. e90746.

22. Skala, M.C. In vivo Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging of Proteinbound and Free NADH in Normal and Pre-cancerous Epithelia / M.C. Skala, K.M. Riching, D.K. Bird, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K.W. Eliceiri, P.J. Keely, N. Ramanujam // Journal of biomedical optics. – 2007. – Vol. 12, N. 2. – P. 024014-024014.

Северин, Е. С. Биологическая химия / Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова,
 Е.В. Осипов, С.А. Силаева. – ООО «Медицинское информационное агентство»,
 2008of.

24. Осикбаева, С. О. Энергетический метаболизм – гликолиз в нормальных и раковых клетках / С.О. Осикбаева, С.Т. Тулеуханов, З.С. Орынбаева // Вестник КазНМУ. – 2017. – Vol. 2.

25. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера / Д. Нельсон, М. Кокс. – Лаборатория знаний, 2017. – N448umber of 448 р.

Xia, W. Roles of NAD(+) / NADH and NADP(+) / NADPH in cell death / W.
Xia, Z. Wang, Q. Wang, J. Han, C. Zhao, Y. Hong, L. Zeng, L. Tang, W. Ying //
Curr Pharm Des. – 2009. – Vol. 15, N. 1. – P. 12-9.

27. Shi, F. Molecular properties, functions, and potential applications of NAD kinases / F. Shi, Y. Li, Y. Li, X. Wang // Acta Biochimica et Biophysica Sinica. – 2009. – Vol. 41, N. 5. – P. 352-361.

28. Heikal, A. A. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies / A.A. Heikal // Biomarkers in medicine. – 2010. – Vol. 4, N. 2. – P. 241-263.

29. Folmes, C. D. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation
/ C.D. Folmes, P.P. Dzeja, T.J. Nelson, A. Terzic // Cell Stem Cell. – 2012. – Vol. 11,
N. 5. – P. 596-606.

30. Corpas,F. J. NADPH-generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro-oxidative stress induced by adverse environmental conditions / F.J. Corpas, J.B. Barroso // Frontiers in Environmental Science. – 2014. – Vol. 2.

 Chakraborty, S. Quantification of the Metabolic State in Cell-Model of Parkinson's Disease by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy / S. Chakraborty, F.-S. Nian, J.-W. Tsai, A. Karmenyan, A. Chiou // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – P. 19145.

Balu, M. Distinguishing between benign and malignant melanocytic nevi by in vivo multiphoton microscopy / M. Balu, K.M. Kelly, C.B. Zachary, R.M. Harris, T.B. Krasieva, K. König, A.J. Durkin, B.J. Tromberg // Cancer research. – 2014. – Vol. 74, N. 10. – P. 2688-2697.

33. Cannon, T. M. Validation and characterization of optical redox ratio measurements with a microplate reader in breast cancer cells / T.M. Cannon, A.T. Shah, M.C. Skala, 2015. – Vol. 9303. P. 93032S-93032S-6.

34. Kunz, W. S. Contribution of different enzymes to flavoprotein fluorescence of isolated rat liver mitochondria / W.S. Kunz, W. Kunz // Biochim Biophys Acta. – 1985. – Vol. 841, N. 3. – P. 237-46.

35. Saks, V. A. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo / V.A. Saks, V.I. Veksler, A.V. Kuznetsov, L. Kay, P. Sikk, T. Tiivel, L. Tranqui, J. Olivares, K. Winkler, F. Wiedemann, W.S. Kunz // Mol Cell Biochem. – 1998. – Vol. 184, N. 1-2. – P. 81-100.

36. Ying, W. NAD+/NADH and NADP+/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences / W. Ying // Antioxidants & Redox Signaling. – 2007. – Vol. 10, N. 2. – P. 179-206.

37. Chaban, Y. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation / Y. Chaban, E.J. Boekema,

N.V. Dudkina // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. – 2014. – Vol. 1837, N. 4. – P. 418-426.

38. Smeitink, J. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation / J.
Smeitink, L. van den Heuvel, S. DiMauro // Nat Rev Genet. – 2001. – Vol. 2, N. 5. –
P. 342-52.

39. Gautheron, D. C. Mitochondrial oxidative phosphorylation and respiratory chain: review / D.C. Gautheron // J Inherit Metab Dis. – 1984. – Vol. 7 Suppl 1. – P. 57-61.

40. Nsiah-Sefaa, A. Combined defects in oxidative phosphorylation and fatty acid  $\beta$ -oxidation in mitochondrial disease / A. Nsiah-Sefaa, M. McKenzie // Bioscience Reports. – 2016. – Vol. 36, N. 2.

41. Vlassenko, A. G. Spatial correlation between brain aerobic glycolysis and amyloid-beta (Abeta ) deposition / A.G. Vlassenko, S.N. Vaishnavi, L. Couture, D. Sacco, B.J. Shannon, R.H. Mach, J.C. Morris, M.E. Raichle, M.A. Mintun // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – Vol. 107, N. 41. – P. 17763-7.

42. Diaz-Ruiz, R. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression / R. Diaz-Ruiz, M. Rigoulet, A. Devin // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. – 2011. – Vol. 1807, N. 6. – P. 568-576.

43. Patterson, G. H. Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet beta cells / G.H. Patterson, S.M. Knobel, P. Arkhammar, O. Thastrup, D.W. Piston // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2000. – Vol. 97, N. 10. – P. 5203-7.

Richards-Kortum, R. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis / R.
Richards-Kortum, E. Sevick-Muraca // Annu Rev Phys Chem. – 1996. – Vol. 47. – P.
555-606.

45. Mortezaee, K. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX) and liver fibrosis: A review / K. Mortezaee // Cell Biochem Funct. – 2018. – Vol. 36, N. 6. – P. 292-302.

46. Islam, M.S. pH Dependence of the Fluorescence Lifetime of FAD in Solution and in Cells / M.S. Islam, M. Honma, T. Nakabayashi, M. Kinjo, N. Ohta // International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – Vol. 14, N. 1. – P. 1952-1963

47. Klaidman, L. K. High-performance liquid chromatography analysis of oxidized and reduced pyridine dinucleotides in specific brain regions / L.K. Klaidman, A.C. Leung, J.D. Adams, Jr. // Anal Biochem. – 1995. – Vol. 228, N. 2. – P. 312-7.

48. Meleshina, A. V. Probing metabolic states of differentiating stem cells using two-photon FLIM / A.V. Meleshina, V.V. Dudenkova, M.V. Shirmanova, V.I. Shcheslavskiy, W. Becker, A.S. Bystrova, E.I. Cherkasova, E.V. Zagaynova // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – P. 1726.

49. Meleshina, A.V. Two-photon FLIM of NAD(P)H and FAD in mesenchymal stem cells undergoing either osteogenic or chondrogenic differentiation / A.V. Meleshina, V.V. Dudenkova, A.S. Bystrova, D.S. Kuznetsova, M.V. Shirmanova, E.V Zagaynova // Stem Cell Research & Therapy. – 2017. – Vol. 8. – P. 21853.

50. Giancaspero, T. FAD synthesis and degradation in the nucleus create a local flavin cofactor pool / T.A. Giancaspero, G. Busco, C. Panebianco, C. Carmone, A. Miccolis, G.M. Liuzzi, M. Colella, M. Barile // The Journal of biological chemistry. – 2013. – Vol. 288, N. 40. – P. 29069-29080.

51. Galban, J. The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: a review / J. Galban, I. Sanz-Vicente, J. Navarro, S. de Marcos // Methods Appl Fluoresc. – 2016. – Vol. 4, N. 4. – P. 042005.

52. Fatakdawala, H. Multimodal in vivo imaging of oral cancer using fluorescence lifetime, photoacoustic and ultrasound techniques / H. Fatakdawala, S. Poti, F. Zhou, Y. Sun, J. Bec, J. Liu, D.R. Yankelevich, S.P. Tinling, R.F. Gandour-Edwards, D.G. Farwell, L. Marcu // Biomedical Optics Express. – 2013. – Vol. 4, N. 9. – P. 1724-1741.

53. Shirmanova, M. V. Chemotherapy with cisplatin: insights into intracellular pH and metabolic landscape of cancer cells in vitro and in vivo / M.V. Shirmanova, I.N. Druzhkova, M.M. Lukina, V.V. Dudenkova, N.I. Ignatova, L.B. Snopova, V.I.

Shcheslavskiy, V.V. Belousov, E.V. Zagaynova // Sci Rep. – 2017. – Vol. 7, N. 1. – P. 8911.

54. Куликов, В. А. О биоэнергетике опухолевой клетки / В.А. Куликов, Л.Е. Беляева // Вестник ВГМУ. – 2015. – Vol. 6.

55. Sundfør, K. Tumour hypoxia and vascular density as predictors of metastasis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix / K. Sundfør, H. Lyng, E.K. Rofstad // British journal of cancer. – 1998. – Vol. 78, N. 6. – P. 822-827.

56. Muz, B. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy / B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, A.K. Azab // Hypoxia (Auckland, N.Z.). – 2015. – Vol. 3. – P. 83-92.

57. Wouters, B. G. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer / B.G. Wouters, M. Koritzinsky // Nat Rev Cancer. – 2008. – Vol. 8, N. 11. – P. 851-64.

58. Marusyk, A. Tumor heterogeneity: causes and consequences / A. Marusyk, K. Polyak // Biochimica et biophysica acta. – 2010. – Vol. 1805, N. 1. – P. 105-117.

59. DeBerardinis, R. J. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation / R.J. DeBerardinis, J.J. Lum, G. Hatzivassiliou, C.B. Thompson // Cell Metabolism. – 2008. – Vol. 7, N. 1. – P. 11-20.

60. Edinger, A. L. Differential effects of rapamycin on mammalian target of rapamycin signaling functions in mammalian cells / A.L. Edinger, C.M. Linardic, G.G. Chiang, C.B. Thompson, R.T. Abraham // Cancer Res. – 2003. – Vol. 63, N. 23. – P. 8451-60.

61. Masson, N. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways / N. Masson, P.J. Ratcliffe // Cancer Metab. – 2014. – Vol. 2, N. 1. – P. 3.

62. Peng, T. The Immunosuppressant Rapamycin Mimics a Starvation-Like Signal Distinct from Amino Acid and Glucose Deprivation / T. Peng, T.R. Golub, D.M. Sabatini // Molecular and Cellular Biology. – 2002. – Vol. 22, N. 15. – P. 5575.

63. Jun, J. Hypoxia-Inducible Factors and Cancer / J.C. Jun, A. Rathore, H. Younas, D. Gilkes, V.Y. Polotsky // Current sleep medicine reports. – 2017. – Vol. 3, N. 1. – P. 1-10.

64. Solaini, G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism / G. Solaini, A. Baracca, G. Lenaz, G. Sgarbi // Biochim Biophys Acta. – 2010. – Vol. 1797, N. 6-7. – P. 1171-7.

65. Zhou, M. Warburg effect in chemosensitivity: Targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes Taxol-resistant cancer cells to Taxol / M. Zhou, Y. Zhao, Y. Ding, H. Liu, Z. Liu, O. Fodstad, A.I. Riker, S. Kamarajugadda, J. Lu, L.B. Owen, S.P. Ledoux, M. Tan // Molecular Cancer. – 2010. – Vol. 9. – P. 33-33.

66. Warburg, O. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY / O.
Warburg, F. Wind, E. Negelein // The Journal of General Physiology. – 1927. – Vol.
8, N. 6. – P. 519.

67. Ksiezakowska-Lakoma, K. Mitochondrial dysfunction in cancer / K. Ksiezakowska-Lakoma, M. Zyla, J.R. Wilczynski // Prz Menopauzalny. – 2014. – Vol. 13, N. 2. – P. 136-44.

68. Hsu, Ch. Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression / C.-C. Hsu,
L.-M. Tseng, H.-C. Lee // Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.). –
2016. – Vol. 241, N. 12. – P. 1281-1295.

69. Zheng, J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review) / J. Zheng // Oncol Lett. – 2012. – Vol. 4, N. 6. – P. 1151-1157.

70. Diaz-Ruiz, R. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression / R. Diaz-Ruiz, M. Rigoulet, A. Devin // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. – 2011. – Vol. 1807, N. 6. – P. 568-576.

71. Cairns, R.A. Regulation of cancer cell metabolism / R.A. Cairns, I.S. Harris,
T.W. Mak // Nat Rev Cancer. – 2011. – Vol. 11.

72. Kim, K. T. Recent Progress in the Development of Poly(lactic-co-glycolic acid)-Based Nanostructures for Cancer Imaging and Therapy / K.T. Kim, J.Y. Lee, D.D. Kim, I.S. Yoon, H.J. Cho // Pharmaceutics. – 2019. – Vol. 11, N. 6.

Georgakoudi, I. Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state / I. Georgakoudi, K.P. Quinn // Annu Rev Biomed Eng. – 2012. – Vol. 14. – P. 351-67.

74. Berridge, M. V. Metabolic flexibility and cell hierarchy in metastatic cancer / M.V. Berridge, P.M. Herst, A.S. Tan // Mitochondrion. – 2010. – Vol. 10, N. 6. – P. 584-8.

75. Brand, K. A. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species / K.A. Brand, U. Hermfisse // Faseb J. – 1997. – Vol. 11, N. 5. – P. 388-95.

76. Lunt, S. Y. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation / S.Y. Lunt, M.G. Vander Heiden // Annu Rev Cell Dev Biol. – 2011. – Vol. 27. – P. 441-64.

77. de la Cruz-López, K. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches / K.G. de la Cruz-López, L.J. Castro-Muñoz, D.O. Reyes-Hernández, A. García-Carrancá, J. Manzo-Merino // Frontiers in oncology. – 2019. – Vol. 9. – P. 1143-1143.

78. Zheng, J. I. E. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review) / J.I.E. Zheng // Oncol Lett. – 2012. – Vol. 4, N. 6. – P. 1151-1157.

79. Nayak, A. Oxidative Phosphorylation: A Target for Novel Therapeutic Strategies Against Ovarian Cancer / A.P. Nayak, A. Kapur, L. Barroilhet, M.S. Patankar // Cancers. – 2018. – Vol. 10, N. 9. – P. 337.

80. Cantor, J. R. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces / J.R. Cantor,
D.M. Sabatini // Cancer Discov. – 2012. – Vol. 2, N. 10. – P. 881-98.

81. Zu, X. L. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction / X.L. Zu, M. Guppy // Biochem Biophys Res Commun. – 2004. – Vol. 313, N. 3. – P. 459-65.

82. Robertson-Tessi, M. Impact of metabolic heterogeneity on tumor growth, invasion, and treatment outcomes / M. Robertson-Tessi, R.J. Gillies, R.A. Gatenby, A.R. Anderson // Cancer Res. – 2015. – Vol. 75, N. 8. – P. 1567-79.

83. Sengupta, D. Imaging metabolic heterogeneity in cancer / D. Sengupta, G.
Pratx // Molecular Cancer. – 2016. – Vol. 15, N. 1. – P. 1-12.

84. Xu, He N. REDOX IMAGING OF THE p53-dependent mitochondrial redox state in colon cancer ex vivo / H.N. Xu, M.I.N. Feng, L. Moon, N. Dolloff, W. El-Deiry, L.Z. Li // Journal of Innovative Optical Health Sciences. – 2013. – Vol. 06, N. 03. – P. 1350016.

85. Shah, A. T. In Vivo Autofluorescence Imaging of Tumor Heterogeneity in Response to Treatment / A.T. Shah, K.E. Diggins, A.J. Walsh, J.M. Irish, M.C. Skala // Neoplasia. – 2015. – Vol. 17, N. 12. – P. 862-870.

86. Zhang, Z. Redox ratio of mitochondria as an indicator for the response of photodynamic therapy / Z. Zhang, D. Blessington, H. Li, T.M. Busch, J. Glickson, Q. Luo, B. Chance, G. Zheng // J Biomed Opt. – 2004. – Vol. 9, N. 4. – P. 772-8.

87. Levitt, J. M. Intrinsic fluorescence and redox changes associated with apoptosis of primary human epithelial cells / J.M. Levitt, A. Baldwin, A. Papadakis, S. Puri, J. Xylas, K. Munger, I. Georgakoudi // J Biomed Opt. – 2006. – Vol. 11, N. 6. – P. 064012.

Natal, R. A. Increased metabolic activity detected by FLIM in human breast cancer cells with desmoplastic reaction: a pilot study / R.d.A. Natal, V.B. Pelegati, C. Bondarik, G.R. Mendonça, S.F. Derchain, C.P. Lima, C.L. Cesar, L.O. Sarian, J. Vassallo, E.S.P.P.F. Ed - Beaurepaire, E. Hillman // Advanced Microscopy Techniques IV; and Neurophotonics II. Optical Society of America. - Munich, 2015. – Vol. 9536. P. 95360L.

89. Quinn, K. P. Quantitative metabolic imaging using endogenous fluorescence to detect stem cell differentiation / K.P. Quinn, G.V. Sridharan, R.S. Hayden, D.L. Kaplan, K. Lee, I. Georgakoudi // Scientific Reports. – 2013. – Vol. 3. – P. 3432.

90. Zhang, Z. Redox ratio of mitochondria as an indicator for the response of photodynamic therapy / Z. Zhang, D. Blessington, H. Li, T.M. Busch, J. Glickson, Q. Luo, B. Chance, G. Zheng // J Biomed Opt. – 2004. – Vol. 9, N. 4. – P. 772-8.

91. Skala, M. Multiphoton Redox Ratio Imaging for Metabolic Monitoring in vivo
/ M. Skala, N. Ramanujam // Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). – 2010. –
Vol. 594. – P. 155-162.

92. Skala, M. C. Longitudinal optical imaging of tumor metabolism and hemodynamics / M.C. Skala, A. Fontanella, L. Lan, J.A. Izatt, M.W. Dewhirst // J Biomed Opt. – 2010. – Vol. 15, N. 1. – P. 3285584.

93. Skala, M. C. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia / M.C. Skala, K.M. Riching, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K.W. Eliceiri, J.G. White, N. Ramanujam // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – Vol. 104, N. 49. – P. 19494-9.

94. Cannon, T. M. High-throughput measurements of the optical redox ratio using a commercial microplate reader / T.M. Cannon, A.T. Shah, A.J. Walsh, M.C. Skala // J Biomed Opt. – 2015. – Vol. 20, N. 1. – P. 010503.

95. Acharya, A. Redox Regulation in Cancer: a double-edged sword with therapeutic potential / A. Acharya, I. Das, D. Chandhok, T. Saha // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2010. – Vol. 3

96. Staniszewski, K. Surface fluorescence studies of tissue mitochondrial redox state in isolated perfused rat lungs / K. Staniszewski, S.H. Audi, R. Sepehr, E.R. Jacobs, M. Ranji // Ann Biomed Eng. – 2013. – Vol. 41, N. 4. – P. 827-36.

97. Sepehr, R. Optical imaging of tissue mitochondrial redox state in intact rat lungs in two models of pulmonary oxidative stress / R. Sepehr, K. Staniszewski, S. Maleki, E.R. Jacobs, S. Audi, M. Ranji // Journal of biomedical optics. – 2012. – Vol. 17, N. 4. – P. 046010.

98. Zheng, J.I.E.Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation / J.I.E. Zheng // Oncology Letters. – 2012. – Vol. 4, N. 6. – P. 1151-1157.

99. Currie, E. Cellular fatty acid metabolism and cancer / E. Currie, A. Schulze, R. Zechner, T.C. Walther, R.V. Farese, Jr. // Cell Metab. – 2013. – Vol. 18, N. 2. – P. 153-61.

100. Fox, C. J. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response / C.J.
Fox, P.S. Hammerman, C.B. Thompson // Nat Rev Immunol. – 2005. – Vol. 5, N. 11.
– P. 844-852.

101. Ostrander, J.H. Optical Redox Ratio Differentiates Breast Cancer Cell Lines
Based on Estrogen Receptor Status / J.H. Ostrander, C.M. McMahon, S. Lem, S.R.
Millon, J.Q. Brown, V.L. Seewaldt, N. Ramanujam // Cancer research. – 2010. – Vol.
70, N. 11. – P. 10.1158/0008-5472.CAN-09-2572.

102. Wu, S. Quantitative evaluation of redox ratio and collagen characteristics during breast cancer chemotherapy using two-photon intrinsic imaging / S. Wu, Y. Huang, Q. Tang, Z. Li, H. Horng, J. Li, Z. Wu, Y. Chen, H. Li // Biomed Opt Express. – 2018. – Vol. 9, N. 3. – P. 1375-1388.

103. Kantelhardt, S. R. In vivo multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging of human brain tumor tissue / S.R. Kantelhardt, D. Kalasauskas, K. Konig, E. Kim, M. Weinigel, A. Uchugonova, A. Giese // J Neurooncol. – 2016. – Vol. 127, N. 3. – P. 473-82.

104. Willem, B. Fluorescence lifetime imaging microscopy in life sciences / J.
Willem Borst, A.J.W.G. Visser // Measurement Science and Technology. – 2010. –
Vol. 21. – P. 102002.

105. Becker, W. Multi-wavelength TCSPC lifetime imaging / W. Becker, A. Bergmann, C. Biskup, T. Zimmer, N. Klöcker, K. Benndorf, A. Becker, H. Gmbh // Proc. SPIE. – 2002. – Vol. 4620. – P. 470679.

106. van Manen, H. J. Refractive index sensing of green fluorescent proteins in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy / H.J. van Manen, P. Verkuijlen, P. Wittendorp, V. Subramaniam, T.K. van den Berg, D. Roos, C. Otto. – Biophys J. 2008 Apr 15;94(8):L67-9. doi: 10.1529/biophysj.107.127837. Epub 2008 Jan 25., of.

107. Bird, D. K. Metabolic Mapping of MCF10A Human Breast Cells via Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging of the Coenzyme NADH / D.K. Bird, L. Yan, K.M. Vrotsos, K.W. Eliceiri, E.M. Vaughan, P.J. Keely, J.G. White, N. Ramanujam // Cancer research. – 2005. – Vol. 65, N. 19. – P. 8766-8773.

108. Duncan, R. R. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to quantify protein-protein interactions inside cells / R.R. Duncan // Biochemical Society transactions. – 2006. – Vol. 34, N. Pt 5. – P. 679-682.

109. Elson, D. Biomedical Applications of Fluorescence Lifetime Imaging / D.
Elson, S. Webb, J. Siegel, K. Suhling, D. Davis, J. Lever, D. Phillips, A. Wallace, P.
French // Optics and Photonics News. – 2002. – Vol. 13, N. 11. – P. 26-32.

110. Ladokhin, A. Evidence for an Excited-state Reaction Contributing to NADH Fluorescence / A. Ladokhin, L. Brand // J Fluoresc. – 1995. – Vol. 5, N. 1. – P. 99-106.

111. Campos-Delgado, D. U. Deconvolution of fluorescence lifetime imaging microscopy by a library of exponentials / D.U. Campos-Delgado, O.G. Navarro, E.R. Arce-Santana, A.J. Walsh, M.C. Skala, J.A. Jo // Opt Express. – 2015. – Vol. 23, N. 18. – P. 23748-67.

112. Skala, M. C. In vivo Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging of Proteinbound and Free NADH in Normal and Pre-cancerous Epithelia / M.C. Skala, K.M. Riching, D.K. Bird, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K.W. Eliceiri, P.J. Keely, N. Ramanujam // Journal of biomedical optics. – 2007. – Vol. 12, N. 2. – P. 024014-024014.

113. Butte, P.V. Fluorescence lifetime spectroscopy for guided therapy of brain tumors / P.V. Butte, A.N. Mamelak, M. Nuno, S.I. Bannykh, K.L. Black, L. Marcu // Neuroimage. – 2011. – Vol. 54, N. Suppl 1. – P. S125-S135.

114. Kalinina, S. Correlative NAD(P)H-FLIM and oxygen sensing-PLIM for metabolic mapping / S. Kalinina, J. Breymayer, P. Schafer, E. Calzia, V. Shcheslavskiy, W. Becker, A. Ruck // J Biophotonics. – 2016.

115. Ruck, A. Spectrally resolved fluorescence lifetime imaging to investigate cell metabolism in malignant and nonmalignant oral mucosa cells / A. Ruck, C. Hauser, S. Mosch, S. Kalinina // J Biomed Opt. – 2014. – Vol. 19, N. 9. – P. 096005.

116. Keller, P.J. Mapping the cellular and molecular heterogeneity of normal and malignant breast tissues and cultured cell lines / P.J. Keller, A. Lin, L.M. Arendt, I. Klebba, A.D. Jones, J.A. Rudnick, T.A. Dimeo, H. Gilmore, D.M. Jefferson, R.A. Graham, S.P. Naber, S. Schnitt, C. Kuperwasser // Breast Cancer Res. – 2010. – Vol. 12.

117. Lukina, M. M. Metabolic cofactors NAD(P)H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel / M.M. Lukina, V.V. Dudenkova, N.I. Ignatova, I.N. Druzhkova, L.E. Shimolina, E.V. Zagaynova, M.V. Shirmanova // Biochim Biophys Acta. – 2018. – Vol. 1862, N. 8. – P. 1693-1700.

118. Seidenari, S. Multiphoton laser tomography and fluorescence lifetime imaging of melanoma: morphologic features and quantitative data for sensitive and specific non-invasive diagnostics / S. Seidenari, F. Arginelli, C. Dunsby, P.M. French, K. Konig, C. Magnoni, C. Talbot, G. Ponti // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, N. 7.

119. Shah, A.T. Optical Metabolic Imaging of Treatment Response in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma / A.T. Shah, M. Demory Beckler, A.J. Walsh, W.P. Jones, P.R. Pohlmann, M.C. Skala // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, N. 3. – P. e90746.

120. Shah, A.T. In Vivo Autofluorescence Imaging of Tumor Heterogeneity in Response to Treatment / A.T. Shah, K.E. Diggins, A.J. Walsh, J.M. Irish, M.C. Skala // Neoplasia (New York, N.Y.). – 2015. – Vol. 17, N. 12. – P. 862-870.

121. Balu, M. In Vivo Multiphoton Microscopy of Basal Cell Carcinoma / M. Balu,
C.B. Zachary, R.M. Harris, T.B. Krasieva, K. Konig, B.J. Tromberg, K.M. Kelly //
JAMA Dermatol. – 2015. – Vol. 151, N. 10. – P. 1068-74.

122. Ramanujan, V. K. Multiphoton fluorescence lifetime contrast in deep tissue imaging: prospects in redox imaging and disease diagnosis / V.K. Ramanujan, J.H. Zhang, E. Biener, B. Herman // J Biomed Opt. – 2005. – Vol. 10, N. 5. – P. 051407.

123. Vergen, J. Metabolic imaging using two-photon excited NADH intensity and fluorescence lifetime imaging / J. Vergen, C. Hecht, L.V. Zholudeva, M.M. Marquardt, R. Hallworth, M.G. Nichols // Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada. – 2012. – Vol. 18, N. 4. – P. 10.1017/S1431927612000529.

124. Schirrmacher, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review) / V. Schirrmacher // International journal of oncology. – 2019. – Vol. 54, N. 2. – P. 407-419.

125. Huang, Ch. A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non–small cell lung cancer / C.-Y. Huang, D.-T. Ju, C.-F. Chang, P. Muralidhar Reddy, B.K. Velmurugan // BioMedicine. – 2017. – Vol. 7, N. 4. – P. 23.
126. Alam, S. R. Investigation of Mitochondrial Metabolic Response to Doxorubicin in Prostate Cancer Cells: An NADH, FAD and Tryptophan FLIM Assay / S.R. Alam, H. Wallrabe, Z. Svindrych, A.K. Chaudhary, K.G. Christopher, D. Chandra, A. Periasamy // Sci Rep. – 2017. – Vol. 7, N. 1. – P. 10451.

127. Chabner, B. A. Chemotherapy and the war on cancer / B.A. Chabner, T.G. Roberts // Nature Reviews Cancer. – 2005. – Vol. 5, N. 1. – P. 65-72.

128. Miller, A. B. Reporting results of cancer treatment / A.B. Miller, B. Hoogstraten, M. Staquet, A. Winkler // Cancer. – 1981. – Vol. 47, N. 1. – P. 207-14.

129. Therasse, P. Measuring the clinical response. What does it mean? / P. Therasse // Eur J Cancer. – 2002. – Vol. 38, N. 14. – P. 1817-23.

130. James, K. Measuring response in solid tumors: unidimensional versus bidimensional measurement / K. James, E. Eisenhauer, M. Christian, M. Terenziani, D. Vena, A. Muldal, P. Therasse // J Natl Cancer Inst. – 1999. – Vol. 91, N. 6. – P. 523-8.

131. Eisenhauer, E. A. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1) / E.A. Eisenhauer, P. Therasse, J. Bogaerts, L.H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L.

Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe, J. Verweij // Eur J Cancer. – 2009. – Vol. 45, N. 2. – P. 228-47.

132. Prasad, S. R. Radiological measurement of breast cancer metastases to lung and liver: comparison between WHO (bidimensional) and RECIST (unidimensional) guidelines / S.R. Prasad, S. Saini, J.E. Sumner, P.F. Hahn, D. Sahani, G.W. Boland // J Comput Assist Tomogr. – 2003. – Vol. 27, N. 3. – P. 380-4.

133. Therasse, P. RECIST revisited: a review of validation studies on tumour assessment / P. Therasse, E.A. Eisenhauer, J. Verweij // Eur J Cancer. – 2006. – Vol. 42, N. 8. – P. 1031-9.

134. Bogaerts, J. Individual patient data analysis to assess modifications to the RECIST criteria / J. Bogaerts, R. Ford, D. Sargent, L.H. Schwartz, L. Rubinstein, D. Lacombe, E. Eisenhauer, J. Verweij, P. Therasse // Eur J Cancer. – 2009. – Vol. 45, N. 2. – P. 248-60.

135. Hwang, K. Response Evaluation of Chemotherapy for Lung Cancer / K.-E.
Hwang, H.-R. Kim // Tuberculosis and respiratory diseases. – 2017. – Vol. 80, N. 2. –
P. 136-142.

136. Trillet-Lenoir, V. Assessment of tumour response to chemotherapy for metastatic colorectal cancer: accuracy of the RECIST criteria / V. Trillet-Lenoir, G. Freyer, P. Kaemmerlen, A. Fond, O. Pellet, C. Lombard-Bohas, J.L. Gaudin, G. Lledo, R. Mackiewicz, M.C. Gouttebel, H. Moindrot, J.D. Boyer, L. Chassignol, N. Stremsdoerfer, F. Desseigne, J.M. Moreau, F. Hedelius, A. Moraillon, F. Chapuis, J.P. Bleuse, Y. Barbier, M.O. Heilmann, P.J. Valette // Br J Radiol. – 2002. – Vol. 75, N. 899. – P. 903-8.

137. Benjamin, R. S. We should desist using RECIST, at least in GIST / R.S. Benjamin, H. Choi, H.A. Macapinlac, M.A. Burgess, S.R. Patel, L.L. Chen, D.A. Podoloff, C. Charnsangavej // J Clin Oncol. – 2007. – Vol. 25, N. 13. – P. 1760-4.

138. Lee, H. Y. New CT response criteria in non-small cell lung cancer: proposal and application in EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy / H.Y. Lee, K.S. Lee, M.J. Ahn, H.S. Hwang, J.W. Lee, K. Park, J.S. Ahn, T.S. Kim, C.A. Yi, M.J. Chung // Lung Cancer. – 2011. – Vol. 73, N. 1. – P. 63-9.

Martens, M. Tumor Response to Treatment: Prediction and Assessment / M.H.
Martens, D.M.J. Lambregts, E. Kluza, R.G.H. Beets-Tan // Current Radiology
Reports. - 2014. - Vol. 2, N. 9. - P. 62.

140. Georgakoudi, I. NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes / I. Georgakoudi, B.C. Jacobson, M.G. Muller, E.E. Sheets, K. Badizadegan, D.L. Carr-Locke, C.P. Crum, C.W. Boone, R.R. Dasari, J. Van Dam, M.S. Feld // Cancer Res. – 2002. – Vol. 62, N. 3. – P. 682-7.

141. Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state / I.
Georgakoudi, K.P. Quinn // Annu Rev Biomed Eng. – 2012. – Vol. 14. – P. 351-67.

142. Huang, S. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein / S. Huang, A.A. Heikal, W.W. Webb // Biophys J. – 2002. – Vol. 82, N. 5. – P. 2811-25.

143. Sharick, J. Cellular Metabolic Heterogeneity In Vivo Is Recapitulated in Tumor Organoids / J.T. Sharick, J.J. Jeffery, M.R. Karim, C.M. Walsh, K. Esbona, R.S. Cook, M.C. Skala // Neoplasia (New York, N.Y.). – 2019. – Vol. 21, N. 6. – P. 615-626.

144. Phan, L. M. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies / L.M. Phan, S.C. Yeung, M.H. Lee // Cancer Biol Med. – 2014. – Vol. 11, N. 1. – P. 1-19.

145. Hammoudi, N. Hammoudi, N. Metabolic alterations in cancer cells and therapeutic implications / N. Hammoudi, K.B.R. Ahmed, C. Garcia-Prieto, P. Huang // Chinese Journal of Cancer. – 2011. – Vol. 30, N. 8. – P. 508-525.

146. Pelicano, H. Glycolysis inhibition for anticancer treatment / H. Pelicano, D.S.
Martin, R.H. Xu, P. Huang // Oncogene. – 2006. – Vol. 25, N. 34. – P. 4633-46.

147. El Mjiyad, N. Sugar-free approaches to cancer cell killing / N. El Mjiyad, A. Caro-Maldonado, S. Ramirez-Peinado, C. Munoz-Pinedo // Oncogene. – 2011. – Vol. 30, N. 3. – P. 253-64.

148. Guo, W. Efficacy of RNAi targeting of pyruvate kinase M2 combined with cisplatin in a lung cancer model / W. Guo, Y. Zhang, T. Chen, Y. Wang, J. Xue, Y.

Zhang, W. Xiao, X. Mo, Y. Lu // J Cancer Res Clin Oncol. – 2011. – Vol. 137, N. 1. – P. 65-72.

149. Zanoni, M. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained / M. Zanoni, F. Piccinini, C. Arienti, A. Zamagni, S. Santi, R. Polico, A. Bevilacqua, A. Tesei // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6, N. 1. – P. 19103.

150. Yu, W. Cisplatin generates oxidative stress which is accompanied by rapid shifts in central carbon metabolism / W. Yu, Y. Chen, J. Dubrulle, F. Stossi, V. Putluri, A. Sreekumar, N. Putluri, D. Baluya, S.Y. Lai, V.C. Sandulache // Sci Rep. – 2018. – Vol. 8, N. 1. – P. 4306.

151. Wang, Sh. Cisplatin suppresses the growth and proliferation of breast and cervical cancer cell lines by inhibiting integrin  $\beta$ 5-mediated glycolysis / S. Wang, J. Xie, J. Li, F. Liu, X. Wu, Z. Wang // American Journal of Cancer Research. – 2016. – Vol. 6, N. 5. – P. 1108-1117.

152. Wang, M. S. Rapid assessment of drug response in cancer cells using microwell array and molecular imaging / M.S. Wang, Z. Luo, N. Nitin // Anal Bioanal Chem. – 2014. – Vol. 406, N. 17. – P. 4195-206.

153. Glass-Marmor, L. Taxol (paclitaxel) induces a detachment of phosphofructokinase from cytoskeleton of melanoma cells and decreases the levels of glucose 1,6-bisphosphate, fructose 1,6-bisphosphate and ATP / L. Glass-Marmor, R. Beitner // Eur J Pharmacol. – 1999. – Vol. 370, N. 2. – P. 195-9.

154. Andre, N. Paclitaxel targets mitochondria upstream of caspase activation in intact human neuroblastoma cells / N. Andre, M. Carre, G. Brasseur, B. Pourroy, H. Kovacic, C. Briand, D. Braguer // FEBS Lett. – 2002. – Vol. 532, N. 1-2. – P. 256-60. 155. Sharma, R. I. Colorectal tumor cells treated with 5-FU, oxaliplatin, irinotecan, and cetuximab exhibit changes in 18F-FDG incorporation corresponding to hexokinase activity and glucose transport / R.I. Sharma, T.A. Smith // J Nucl Med. – 2008. – Vol. 49, N. 8. – P. 1386-94.

156. Huang, Y. Curcumin enhances the effects of irinotecan on colorectal cancer cells through the generation of reactive oxygen species and activation of the

endoplasmic reticulum stress pathway / Y.-F. Huang, D.-J. Zhu, X.-W. Chen, Q.-K. Chen, Z.-T. Luo, C.-C. Liu, G.-X. Wang, W.-J. Zhang, N.-Z. Liao // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8, N. 25. – P. 40264-40275.

157. Bjurberg, M. Early Metabolic Flare in Squamous Cell Carcinoma after Chemotherapy is a Marker of Treatment Sensitivity In Vitro / M. Bjurberg, P. Abedinpour, E. Brun, B. Baldetorp, P. Borgström, J. Wennerberg, E. Kjellén // Nuclear Medicine and Molecular Imaging. – 2010. – Vol. 44, N. 3. – P. 165-169.

158. Alborzinia, H. Real-Time Monitoring of Cisplatin-Induced Cell Death / H. Alborzinia, S. Can, P. Holenya, C. Scholl, E. Lederer, I. Kitanovic, S. Wölfl // PLOS ONE. – 2011. – Vol. 6, N. 5. – P. e19714.

159. Sato, S. Single-cell lineage tracking analysis reveals that an established cell line comprises putative cancer stem cells and their heterogeneous progeny / S. Sato, A. Rancourt, Y. Sato, M.S. Satoh // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6, N. 1. – P. 23328.

160. Wenzel, C. 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions / C. Wenzel, B. Riefke, S. Grundemann, A. Krebs, S. Christian, F. Prinz, M. Osterland, S. Golfier, S. Rase, N. Ansari, M. Esner, M. Bickle, F. Pampaloni, C. Mattheyer, E.H. Stelzer, K. Parczyk, S. Prechtl, P. Steigemann // Exp Cell Res. – 2014. – Vol. 323, N. 1. – P. 131-43.

161. Vander Heiden, M. G. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation / M.G. Vander Heiden, L.C. Cantley, C.B. Thompson // Science. – 2009. – Vol. 324.

162. Christofk, H. R. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth / H.R. Christofk, M.G. Vander Heiden, M.H. Harris, A. Ramanathan, R.E. Gerszten, R. Wei, M.D. Fleming, S.L. Schreiber, L.C. Cantley // Nature. – 2008. – Vol. 452, N. 7184. – P. 230-3.

163. DeBerardinis, R.J. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis / R.J. DeBerardinis, A. Mancuso, E. Daikhin, I. Nissim, M. Yudkoff, S.

Wehrli, C.B. Thompson // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – Vol. 104, N. 49. – P. 19345-50.