

На правах рукописи



Турубанова
Виктория Дмитриевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ИММУННОГО ОТВЕТА
ПРИ ФОТОЗАВИСИМОЙ ИММУНОГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ**

1.5.5 – физиология человека и животных

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Нижний Новгород – 2021

Работа выполнена на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского"

Научные руководители	Ведунова Мария Валерьевна , доктор биологических наук; Крысько Дмитрий Вадимович , доктор медицинских наук.
-----------------------------	--

Официальные оппоненты	Талаев Владимир Юрьевич , доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник - заведующий лабораторией клеточной иммунологии Федерального бюджетного учреждения науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Глушкова Ольга Валентиновна , доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов рецепции Института биофизики клетки Российской академии наук.
------------------------------	---

Ведущая организация	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства».
----------------------------	--

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.2.340.06 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского" по адресу: 603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/files/2021/1142/diss-Turubanova-1142.pdf>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Акинчиц Елена Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Онкология является причиной растущей смертности во всем мире, при этом по данным международного агентства по исследованию рака (International Agency for Research on Cancer GLOBOCAN) к 2025 году прогнозируется увеличение на 20,3 миллиона новых случаев заболевания в год. Существующие стратегии лечения опухолей не оказывают должного терапевтического эффекта и не существует эффективных методов предотвращения рецидивов. Развитие новых средств сосредоточено сейчас на вовлечении иммунитета в борьбу со злокачественными образованиями. Известно несколько подходов стимуляции противоопухолевого иммунного ответа. Один из них был независимо разработан Джеймсом Эллисоном и Тасуку Хёндзё и предполагает терапию ингибированием контрольных точек. Этот подход основан на блокировании CTLA-4 и PD-1 на мембране Т-клеток, которые препятствуют образованию клонов CD8⁺Т-киллеров и элиминации опухолевых антигенов (Wei et al., 2017; Chamoto et al., 2017). В число подходов иммунотерапии входит индукция иммуногенной клеточной гибели. Концепция заключается в том, что после цитотоксического воздействия онкотрансформированные клетки умирают, высвобождая в межклеточное пространство иммуностимулирующие молекулы, ассоциированные с повреждением DAMPs (damage-associated molecular patterns). Эти молекулы играют ключевую роль в созревании антигенпрезентирующих клеток и активации Т-клеточного ответа на специфический опухолевый антиген. Таким образом комбинируется цитотоксический эффект на раковые клетки и опосредованный иммунный ответ самого организма (Galluzzi et al., 2020). Иммуногенная клеточная смерть — это общий термин, который включает несколько регулируемых форм клеточной гибели, таких как апоптоз (Galluzzi et al., 2020; Aaes et al., 2020), некроптоз (Aaes et al., 2016) и ферроптоз (Efimova et al., 2020).

Одним из методов, вызывающих иммуногенную клеточную смерть (Immunogenic cell death, ICD) в раковых клетках, является фотодинамическая терапия (ФДТ). Этот метод предполагает введение фотосенсибилизирующего агента в клетки с последующей фотоактивацией светом определенной длины волны. Это приводит к запуску свободнорадикальных процессов и образованию синглетного кислорода, который оказывает цитотоксический эффект (Liu et al., 2004; Garg et al. 2012; Gomes-da-Silva et al., 2018, Alzeibak et al., 2020). Наряду с химиотерапией, фотодинамическое воздействие способно активировать регулируемые формы клеточной гибели, образует локальное воспаление и стимулирует специфический противоопухолевый иммунный ответ (Garg et al., 2010; Li et al., 2019).

В настоящее время известно только несколько фотосенсибилизаторов, вызывающих иммуногенную клеточную смерть в опухолевых клетках, а

именно гиперичин (Adkins et al., 2015), 5-ALA (Garg et al., 2016), ацетат бенгальской розы (Panzarini et al., 2014), гликоконъюгированный хлорин, фоскан и другие (Korbelik et al., 2011; Dudek et al. 2013, Mitra et al., 2011). Известно, что фотоагенты различной химической природы активируют разные биохимические каскады в опухолевых клетках и этим обуславливается тип клеточной смерти (Dolphin et al., 1996; Uzdensky et al., 2001; Peng et al., 2005; Gomes-da-Silva et al., 2018). Критическим в процессе фотоповреждения является локализация фотоагента в органеллах клетки, так как синглетный кислород может повреждать только структуры, находящиеся в непосредственной близости от молекул фотосенсибилизатора (Moan and Berg, 1991, Uzdensky, 2010). Запускаемые молекулярные каскады ведут к активации программ регулируемой клеточной гибели, которые могут быть ингибированы специфическими блокаторами (Aaes et al., 2020, Efimova et al., 2020).

Фотодинамическая терапия обладает низкой токсичностью для нормальных тканей, отсутствием механизмов резистентности, возможностью комбинации с другими методами лечения, удобством применения. Запуск механизма иммуногенной клеточной смерти при помощи фотодинамического воздействия способствует стимуляции противоопухолевого иммунитета, что является основным преимуществом по сравнению с традиционными методами лечения онкологических заболеваний, которые являются иммунологически не активными или даже иммунодепрессивными. Поэтому важно проводить изучение свойств фотосенсибилизаторов и оценки их иммуногенного вклада в гибель раковых клеток.

В представленной работе исследовались клинически-одобренные препараты для фотодинамической терапии Фотосенс (ГНЦ «НИОПИК», Россия) и Фотодитазин («Вета-гранд», Россия), которые используются в терапии мезотелиомы, раке пищевода, злокачественного плеврита, раке простаты, женских половых органов, нейроонкологий и других (Лагода и др., 2000; Трушина и др., 2001; Трахтенберг и др., 2012). В совокупности с химиотерапией и лазерной гипертермией препараты применяются в лечении рака кожи и слизистых, а также при метастазах рака молочной железы. Также в работе были исследованы иммуногенные свойства новых фотодинамических агентов собственной разработки ИМХ РАН из группы тетра(арил)тетрацианопорфиразинов с различными арильными группами в качестве боковых заместителей.

Цель и основные задачи исследования

Целью настоящего исследования стало изучение особенностей противоопухолевого иммунного ответа при индукции фотозависимой иммуногенной клеточной смерти.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Определить локализацию фотосенсибилизаторов и тип клеточной смерти вследствие фотодинамического воздействия для клеток глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205;
2. Выявить особенности высвобождения молекулярных паттернов ассоциированных с повреждением при фотоиндуцированной клеточной гибели для разных типов опухолевых клеток;
3. Оценить фенотипический статус дендритных клеток и интенсивность высвобождения цитокинов при совместном культивировании с фотоиндуцированными клетками;
4. Проанализировать иммуногенный потенциал фотоиндуцированных опухолевых клеток на моделях профилактической противоопухолевой вакцинации *in vivo*.

Научная новизна

Впервые для клеток глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205 определена локализация фотосенсибилизаторов в компартментах клетки и тип клеточной смерти вследствие фотодинамического воздействия. Показано, что накопление фотоагентов различной химической природы в аппарате Гольджи приводило к апоптотической гибели опухолевых клеток, тогда как локализация в лизосомах ассоциирована с гибелью по пути ферроптоза и некроптоза. Таким образом, накопление в ЭПР, аппарате Гольджи и лизосомах вызывало регулируемые формы клеточной смерти при фотодинамическом воздействии.

Впервые проанализированы уровни высвобождения опухолевыми клетками ключевых DAMPs вследствие индукции фотоагентами фотосенс и фотодитазин, порфиразин I и III.

Показана активация компонентов иммунной системы в ответ на взаимодействие с опухолевыми клетками после ФДТ *in vitro*. Фотоиндуцированные клетки опухолевых линий вызывают фенотипическое созревание дендритных клеток. Препараты фотосенс и фотодитазин в модели активации антигенпрезентирующих клеток *in vitro* активируют поверхностную экспрессию ко-стимулирующей молекулы CD86, способствующей дифференцировке Т-лимфоцитов. В группе применения фотосенсибилизаторов порфиразин I и порфиразин III на поверхности дендритных клеток зарегистрирована экспрессия маркера дифференцировки CD80, который также является активатором специфического иммунного ответа. В отдельных группах дендритных клеток, сокультивированных с умирающими клетками фибросаркомы, установлена повышенная экспрессия главного комплекса гистосовместимости 2 класса (МНС II) и ко-стимулирующей молекулы CD40.

Охарактеризован уровень провоспалительного цитокина IL-6 в супернатантах дендритных клеток после взаимодействия с фотоиндуцированными клетками. Установлены высокие уровни интерлейкина-6 в группах с использованием фотосенса и фотодитазина, что говорит о иммуногенности умирающих опухолевых клеток.

На модели профилактической противоопухолевой вакцинации *in vivo* самок иммунокомпетентной линии мышей показаны ярко выраженные признаки активации адаптивной иммунной системы с применением всех изучаемых фотосенсибилизаторов. При иммунизации клетками, обработанных фотосенсом, фотодитазином, порфиразинами I и III, установлено значимое снижение интенсивности развития опухолевых процессов.

Впервые при использовании новых тетра(арил)тетрацианопорфиразинов доказана роль адаптивного иммунитета в противоопухолевом ответе организма на модели иммунодефицитных животных.

При иммунизации мышей показано, что фотосенс-индуцированные клетки глиомы линии GL261 эффективно защищают от развития опухолевого очага, а дендритноклеточная вакцина на основе фотоактивированных клеток значительно увеличивает выживаемость животных. Это свидетельствует о иммуногенности гибели опухолевых клеток после фотодинамического воздействия и является основой терапевтического протокола применения вакцины на основе дендритных клеток.

Научно-практическая значимость

Исследования способности различных цитотоксических агентов запускать иммуногенную клеточную смерть имеют большое значение для развития подходов к лечению злокачественных образований. Вектор развития противоопухолевой терапии направлен на достижение долгосрочного терапевтического эффекта. Анализ иммуногенных свойств коммерческих фотосенсибилизаторов, которые широко применяются в клинической практике, в перспективе позволит скорректировать тактику лечения и повысить эффективность противоопухолевой терапии.

Изучение новых тетраалилтетрацианопорфиразинов, сочетающих в себе свойства фотоагентов со свойствами флуоресцирующих молекулярных роторов, представляет собой интерес, поскольку фотоактивируемая гибель клетки сопровождается изменением ее вязкостных свойств. При использовании данных фотосенсибилизаторов становится возможным мониторинг функционального состояния клеток облучаемой ткани непосредственно в ходе процедуры.

Новые подходы и возможности использования фотодинамической терапии позволят расширить их применение и разработать индивидуальные опухолеспецифичные стратегии лечения онкологических заболеваний на основе запуска программ иммуногенной клеточной смерти. Активация иммунного ответа, специфичного для раковых клеток, генерирует сильный и длительный противораковый иммунитет (Casares et al., 2005, Galluzzi et al., 2017).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Накопление исследуемых фотосенсибилизаторов в ЭПР, аппарате Гольджи и лизосомах вызывает регулируемые формы клеточной смерти.
2. Различные по химическому строению и клеточной локализации фотоагенты способны активировать компоненты иммунной системы *in vitro*.
3. При иммунизации мышей разными типами вакцин (умирающими опухолевыми клетками и дендритноклеточной вакциной) на основе фотоиндуцированных опухолевых клеток активируются адаптивные иммунные реакции, подавляющие опухолевый рост.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также совместно с соавторами участвовал в написании научных статей и апробации результатов исследования на семинарах, конференциях и симпозиумах.

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и обусловлена широкой апробацией и надёжностью использования экспериментальных методов исследования, а также качественной и количественной согласованностью с результатами независимых исследований других авторов.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на 18 международных и российских мероприятиях, в том числе: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-

2019» (8 - 12 апреля 2019, Москва), 23-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (15 - 19 апреля 2019, Пушино), «7th OncoPoint Symposium» (20 марта 2019, Гент, Бельгия), XV Международный междисциплинарный Конгресс "Нейронаука для медицины и психологии" и научная Школа "Достижения междисциплинарной нейронауки в XXI веке" (30 мая – 10 июня 2019, Судак, Крым), 72-я всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (23 - 26 апреля 2019, Нижний Новгород), XXI Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (24 - 29 февраля 2020, Курчатовский институт, Санкт-Петербург), Международная конференция «14th digital World Immune Regulation Meeting» (WIRM, 2020), 73-я всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (28 - 30 октября 2020, Нижний Новгород), 25 Нижегородская сессия молодых ученых (10 - 13 ноября 2020, Нижний Новгород) и др.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 23 работы, из них 5 статей в реферируемых журналах, входящих в перечень ВАК, 18 тезисов в сборниках всероссийских и международных конференций

Структура и объем диссертации

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы. Работа изложена на 139 страницах, содержит 52 рисунка и 2 таблицы. Список литературы содержит 151 источник.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Исследование выполнялось с использованием постоянных клеточных линий глиомы мышцы GL261 и фибросаркомы мышцы MCA205; а также первичных культур дендритных клеток костного мозга мышей линии C57BL/6J. Культивирование опухолевых линий проводилось согласно паспорту культуры, для дендритных клеток использовался протокол Maes et al., 2009. Работы с культурами клеток проводились в специально оборудованных стерильных помещениях, культивирование производилось в условиях CO₂-инкубатора с постоянным поддержанием температуры 35°C и 5%CO₂.

В качестве *in vivo* объектов использовались мыши линии C57BL/6J и Nude. Животные содержались в сертифицированном виварии Национального исследовательского Нижегородского государственного университета, и исследовательская работа проводилась в соответствии с требованиями приказом №267 МЗ РФ от 19.06.2003, а также в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» и отвечали требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов», и были согласованы с биоэтической комиссией ННГУ.

В работе изучались следующие фотоагенты: фотосенс (Ниопик, Россия), фотодитазин (Бета-гранд, Россия), тетра(арил)тетрацианопорфиразины, а именно порфиразин I (фенантрен, pz I) и порфиразин III (фторбензил-О-фенил, pz III) (разработанные и предоставленные ИМХ РАН).

Анализ накопления фотосенсибилизаторов и локализации в компартментах клетки проводились с использованием системы лазерной сканирующей микроскопии Axiovert 200 M LSM META NLO (Carl Zeiss, Германия) и LSM 800 (Carl Zeiss, Германия). Для окраски использовались MitoTracker Green FM (Molecular probes) для окраски митохондрий, LysoTracker Green DND-26 (Molecular probes) для окраски лизосом, Hoechst 33342 (Molecular probes) для окраски ядра, ER-Tracker Green (BODIPY) (Molecular probes) для Эндоплазматического ретикулума, CellMask Green plasma membrane stain (Molecular probes) для окраски плазматической мембраны и BODIPY FL C5-ceramide complexed to BSA (Invitrogen) для окраски Аппарата Гольджи.

Для индукции клеточной смерти использовался светодиодный излучатель с фиксированной длиной волны 630 нм. Клетки облучались в дозе 20 Дж/см². По разработанному протоколу клетки культивировались на чашках Петри диаметром 60 мм. Загрузка фотосенсибилизатора проводилась в

течение 4 часов в бессывороточной среде. Далее облучение культуры проводилось в полной среде после отмывки от фотосенсибилизатора.

С целью определения типа клеточной смерти проводился ингибиторный анализ с использованием ингибиторов апоптоза zVAD-fmk, некроптоза – necrostatin 1, ферроптоза – ferrostatin-1s и хелатора железа DFO.

Оценка жизнеспособности проводилась 2 способами. Окраской FITC Annexin V (Invitrogen) и DAPI (Thermo Fisher Scientific) определялся процент AnV+DAPI+ популяции. Анализ выполняли на проточном цитометре BD FACSCanto. Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения FlowJo. Анализ MTT (AlfaAesar) выполняли в соответствии с инструкциями производителя, и оптическую плотность измеряли при 570 нм в Synergy MX Microplate Reader (BioTek).

Для анализа высвобождения DAMPs клетки отбирались через 20-24 часа (ATP и HMGB1) после индукции. После указанной временной точки супернатант собирали и очищали от умирающих опухолевых клеток центрифугированием, замораживали при -20 ° C для последующего количественного определения HMGB1 с помощью набора для ELISA (IBL-Hamburg). Все анализы были выполнены в соответствии с инструкциями соответствующих производителей, с использованием ридера для микропланшетов Tecan Spark®.

Анализ количества высвободившегося АТФ выполняли с использованием набора для анализа жизнеспособности на основе люминесценции клеток CellTiter-Glo® (Promega, G7571). Клетки прединкубировали с фотосенсибилизатором в среде, содержащей 2% сыворотки. Далее супернатанты живых и умирающих фотоиндуцированных клеток использовали для анализа содержания АТФ.

Для обнаружения эктокальретикулина клетки отбирались через 1,5-3 часа после индукции. Кальретикулин детектировали цитофлуориметрией с предварительным иммуноокрашиванием антителами anti-calreticulin antibody (ab210431; 0.5 mg/ml).

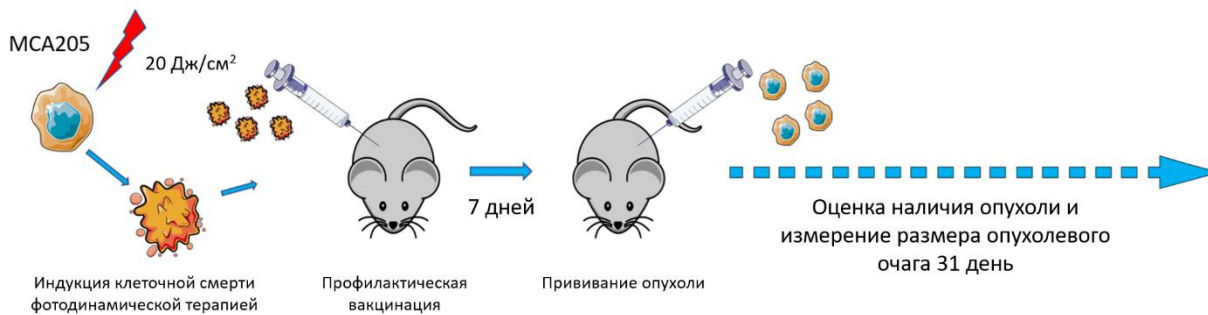
Дендритные клетки костного мозга мыши изолировались из бедренных и большеберцовых костей мышей C57BL/6J 6-8 недель с использованием среды RPMI (GIBCO) с добавлением 5% термоинактивированной телячьей сыворотки, 20 нг / мл mGM-CSF, 1% L-глутамина и 50 мкМ 2-меркаптоэтанола. Свежую культуральную среду добавляли на 3-й день, а на 6-й и 9-й день среду обновляли для роста и размножения культуры.

Клетки-мишени GL261 и MCA205 метили 1 мкМ CellTracker Green CMFDA (Molecular Probes) в бессывороточной среде в течение 30 мин, а затем либо оставляли без воздействия, либо вызывали гибель с помощью ФДТ с применением различных фотосенсибилизаторов. Клетки собирали, промывали и совместно культивировали с дендритными клетками в

соотношении 1: 1, 1: 5 или 1:10 в течение 2 часов. Затем совместно культивированные клетки собирали, иммуноокрашивали PE-Cy-anti-CD11c (BD PharMingen, 561022) и, наконец, анализировали проточной цитометрией на BD FACSCanto. Анализ проводился с помощью программы FlowJo (v.10.0.8). Истинное поглощение CMFDA-меченого материал мертвых клеток дендритными клетками определялось с использованием стратегии стробирования как CD11c CMFDA дважды положительные клетки.

Для определения фенотипического статуса дендритных клеток после сокультивирования в течении 24 часов мертвые клетки исключали из анализа проточной цитометрии путем окрашивания SYTOX Blue (Molecular Probes, S11348). Созревание дендритных клеток анализировали с помощью иммуноокрашивания PE-Cy-anti-CD11c (BD PharMingen), APC- или eFluor 450-anti-CD86 (eBioscience), Pacific Blue-anti-CD40 (Biolegend), eFluor 45-anti-CD80 (Thermo Fisher Scientific) и блок Fc мыши (Thermo Fisher Scientific). После совместного культивирования антигенпрезентирующих клеток с опухолевыми клетками MCA205 супернатанты собирали и определяли IL-6 с помощью иммуноферментного анализа (BioLegend, 431304).

В модели противоопухолевой вакцинации самкам мышей C57BL/6J (7-8 недель) или Nude (6-8 недель) подкожно инъецировали 5×10^5 умирающих клеток MCA205 или GL261 в левый бок. На 8 день после вакцинации мышам проводили заражение опухолевыми клетками на противоположной стороне: 1×10^5 живых опухолевых клеток. Рост опухоли в месте заражения контролировали с помощью штангенциркуля в течение до 4 недель после



привития опухоли. Мышей выводили из эксперимента, когда опухоли становились некротическими или превышали 2 см³.

Основу дендритноклеточной вакцины составляли изолированные десятидневные культуры ДК костного мозга самок мышей линии C57BL/6J возраста 6-8 недель. Опухолевые клетки глиомы мыши GL261 были индуцированы по вышеописанному протоколу и инкубировались 24 часа. После клетки подвергались 6 циклам замораживания при -80°C и оттаиванию на водяной бане при 55°C. 2 мг протеина клеточного лизата добавлялось к суспензии 10×10^6 дендритных клеток на 90 минут. С целью гиперактивации

дендритных клеток, далее была проведена 24-часовая инкубация клеток с липополисахаридом (0,5 мкг/мл).

Мышам линии C57BL/6 была проведена двукратная внутривенная инъекция дендритными клетками в количестве 1×10^6 с перерывом в 7-8 дней. Через 7 дней после последней вакцинации проведена интракраниальная инъекция жизнеспособных клеток глиомы GL261.

В постоперационном периоде у животных оценивался неврологический статус и динамика роста опухоли методом МРТ. Послойные срезы в фронтальной плоскости с получением T1-томограмм, взвешенных по протонной плотности, осуществляли, применяя импульсную последовательность MGEMS (multi gradient echo multi slice, «разноградиентное многослойное эхо») с параметрами: TR=1000 мс, TE=1.49мс, количество эхо – 6, FOV – 20x20 мм, матрица – изначально использовалась 128x128, а затем 256x256, толщина среза – 1 мм, количество срезов – 15, время сканирования – 17мин 04 с.

Статистический анализ был выполнен в программе GraphPad Prism (v.6.0). Для выбора статистического критерия использовался тест Д'Агостино-Пирсона на нормальность. Выживаемость клеток при ингибировании разных путей клеточной смерти анализировали при помощи t-критерия Уэлча. В экспериментах, в которых проводился количественный анализ высвобождения DAMPs и анализ фагоцитоза проводился с помощью теста Манна-Уитни. Для оценки созревания использовали t-критерий для независимых выборок с использованием критерия Уэлча или тест Манна-Уитни. Кривые выживаемости Каплана-Мейера, показывающие график развития опухоли, анализировали с помощью лог-рангового теста Мантела-Кокса. Различия между объемами опухолей в экспериментах по профилактической вакцинации против опухолей *in vivo* анализировали с помощью непараметрического критерия Уилкоксона.

Результаты и их обсуждение

Анализ накопления и локализации фотосенсибилизаторов в компартментах опухолевых клеток

Локализация фотосенсибилизатора является одним из ключевых факторов, определяющих первичные мишени при облучении и весь ход последующего развития внутриклеточных событий, включая молекулярные механизмы ответа на воздействие и тип смерти.

Описаны спектральные характеристики всех фотосенсибилизаторов, и показано накопление и локализация фотоагентов в компартментах клеток

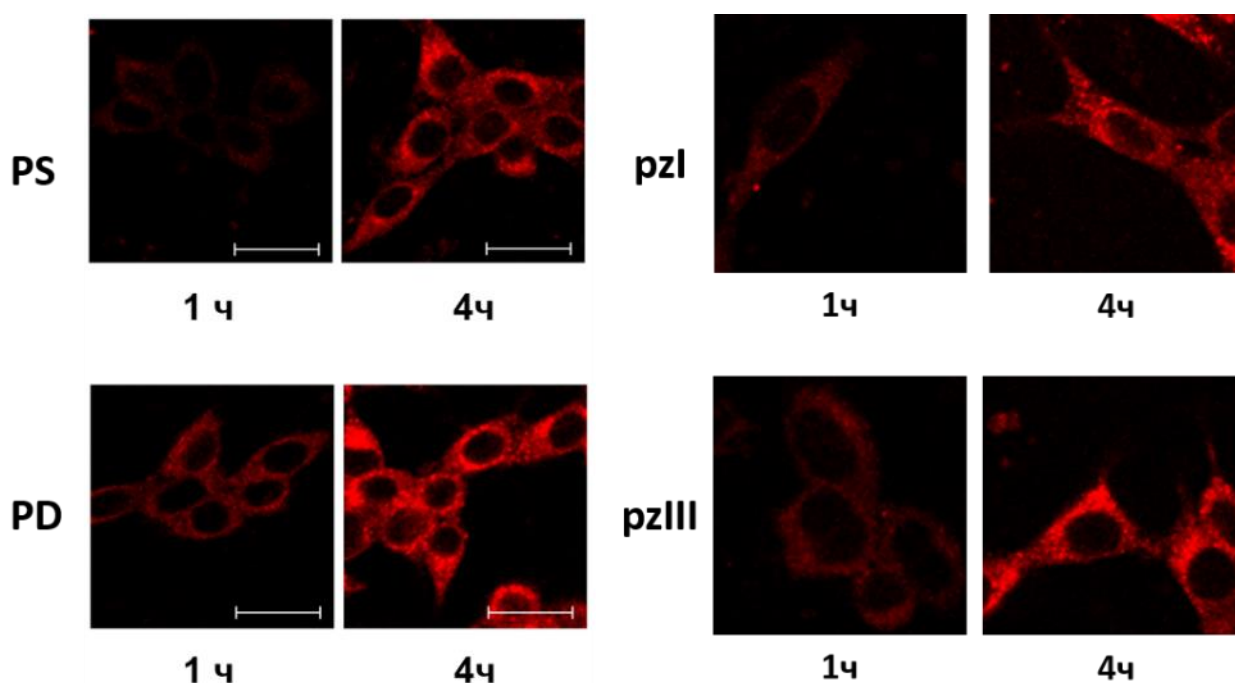


Рисунок 1. Накопление фотосенсибилизаторов в клетках глиомы GL261 на конфокальных изображениях

глиомы мыши GL261 (Рис. 1) и фибросаркомы MCA205. Морфологически и метаболически отличающиеся типы клеток двух клеточных линий по-разному накапливали фотоагенты и реагировали на фотодинамическое воздействие.

Место накопления соединения в органеллы определяется химической природой фотоагента. Показано, что фотосенсибилизаторы фотодитазин, порфиразин I и порфиразин III локализуются в Аппарате Гольджи, но также накапливаются в эндоплазматической сети клеток глиомы мыши (Табл. 1). Фотосенс локализуется в основном в лизосомах, хотя также наблюдался в небольшом количестве в эндоплазматическом ретикулуме. Такая локализация характерна для гидрофильных фталоцианинов и объясняется лизосомотропным эффектом.

Таблица 1. Локализация разных фотоагентов в компартментах клеток глиомы мыши линии GL261

Фотоагент	Локализация в клетках глиомы GL261				
	лизосомы	митохондрии	ЭПР	Аппарат Гольджи	Ядро
Фотосенс	+	—	+	—	—
Фотодитазин	—	—	+	+	—
Порфиразин I	—	—	+	+	—
Порфиразин III	—	—	+	+	—

В лизосомах клеток фибросаркомы также отмечалось присутствие обоих порфиразинов. Помимо этого, в аппарате Гольджи клеток фибросаркомы MCA205 накапливается порфиразин I, в то время как порфиразин III зафиксирован в ЭПР.

Регулируемая индукция клеточной гибели и определение типа клеточной смерти опухолевых клеток

Был разработан протокол индукции клеточной смерти, который предполагает фотодинамическое воздействие на культуры опухолевых клеток с использованием выбранных фотосенсибилизаторов. Выбраны оптимальные условия облучения клеток, которые заключаются в свете длиной волны 630 нм и равномерной дозе излучения в 20 Дж/см² (Рис. 2).

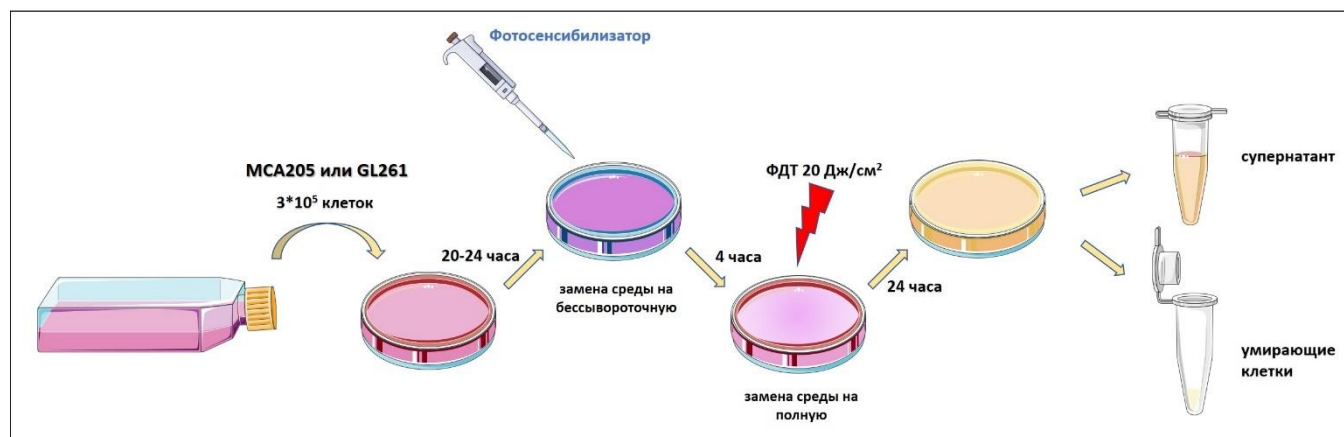


Рисунок 2. Схема индукции клеточной смерти опухолевых линий

Проанализирован тип клеточной смерти опухолевых клеток при фотодинамическом воздействии и определено, что клетки при накоплении фотосенса погибают по смешанному пути апоптоза и ферроптоза, при использовании фотодитазина – апоптоза. Порфиразины, воздействующие на опухолевые клетки запускают апоптотические программы, но также реагируют на хелаторы железа, что является предпосылкой к ферроптотической смерти. Тип клеточной гибели важен в определении

механизма гибели, ассоциированном с локализацией фотоагента в органеллах клетки (Табл. 2).

Таблица 2. Локализация в клеточных компартментах и тип клеточной смерти опухолевых клеток при воздействии разных фотосенсибилизаторов

фотосенсибилизатор	клеточная линия	накопление в органеллах	тип клеточной смерти
фотосенс	GL261	лизосомы	апоптоз, ферроптоз
фотодитазин	GL261	аппарат Гольджи, ЭПР	апоптоз
порфиразин I	GL261	аппарат Гольджи, ЭПР	апоптоз
	MCA205	аппарат Гольджи, лизосомы	апоптоз
порфиразин III	GL261	аппарат Гольджи	апоптоз, ферроптоз
	MCA205	ЭПР, лизосомы	апоптоз, некроптоз

Анализ высвобождения DAMPs умирающими клетками фибросаркомы и глиомы мыши

В качестве DAMPs были рассмотрены ядерный белок HMGB1, свободный АТФ, испускаемый в качестве сигнала «съешь меня» и ранний эктокальретикулин. Исследована реакция двух опухолевых линий на

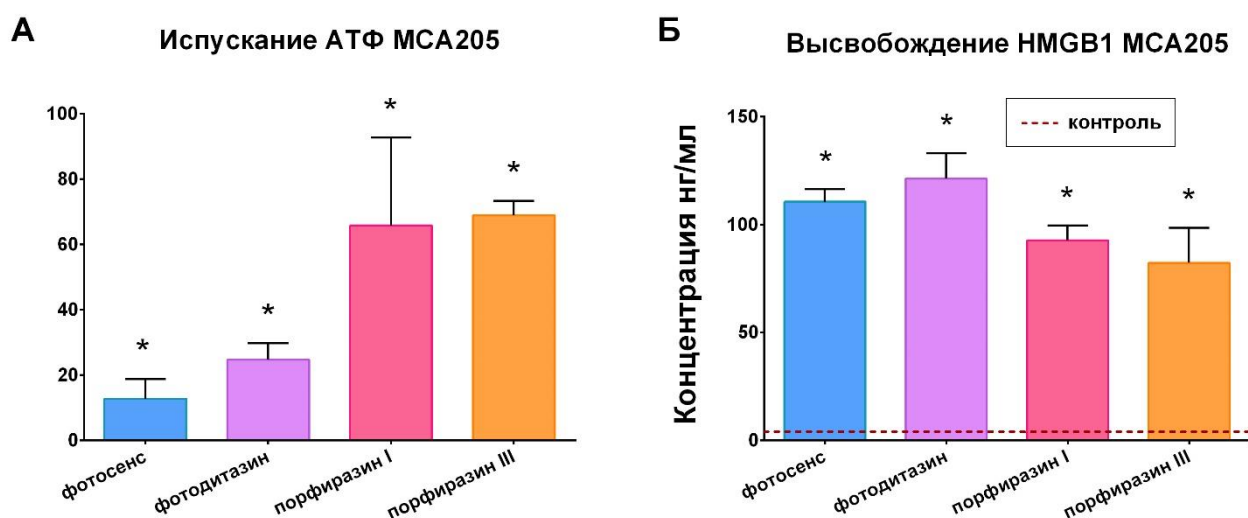


Рисунок 3. Высвобождение ключевых DAMPs фотоиндуцированными клетками фибросаркомы мыши МСА205. **А** – значения представлены кратным увеличением АТФ по сравнению с необработанными клетками $\pm$ стандартная ошибка среднего, $n = 4$, * - $p = 0,001$, критерий Манна-Уитни. **Б** - значения HMGB1 представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, $n \geq 4$, * - $p = 0,01$, критерий Манна-Уитни

индукцию клеточной гибели. Опухолевые клетки в течение первых трех часов после фотодинамического воздействия экспонируют кальретикулин, что является ранним маркером морфологических изменений клетки. Позже, через 18-24 часа клетки испускают АТФ и HMGB1, которые определяются в супернатантах клеток (Рис. 3). Эти молекулы позволяют сигнализировать антигенпрезентирующим клеткам о подступающей опасности. Высвобождение молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением DAMPs является важным маркером иммуногенной клеточной смерти. Проведенный количественный анализ испускаемых умирающими клетками иммуностимулирующих молекул демонстрирует иммуногенный потенциал фотоиндуцированной клеточной смерти.

Для клеточной линии глиомы GL261 показано, что наибольший выход HMGB1 вызвал порфиразин I, при этом наибольший уровень АТФ во внеклеточной среде зафиксирован в группе клеток глиомы, обработанных фотосенсом с совокупности с ФДТ.

Определение фенотипического статуса антигенпрезентирующих клеток после сокультивирования с умирающими опухолевыми клетками

Дендритные клетки костного мозга были сокультивированы с опухолевыми линиями фибросаркомы MCA205 и глиомы GL261. В течение двух часов показано, что клетки, индуцированные всеми выбранными фотосенсибилизаторами, активно фагоцитируются антигенпрезентирующими клетками в различных соотношениях в течение 2-х часов (Рис. 4). С

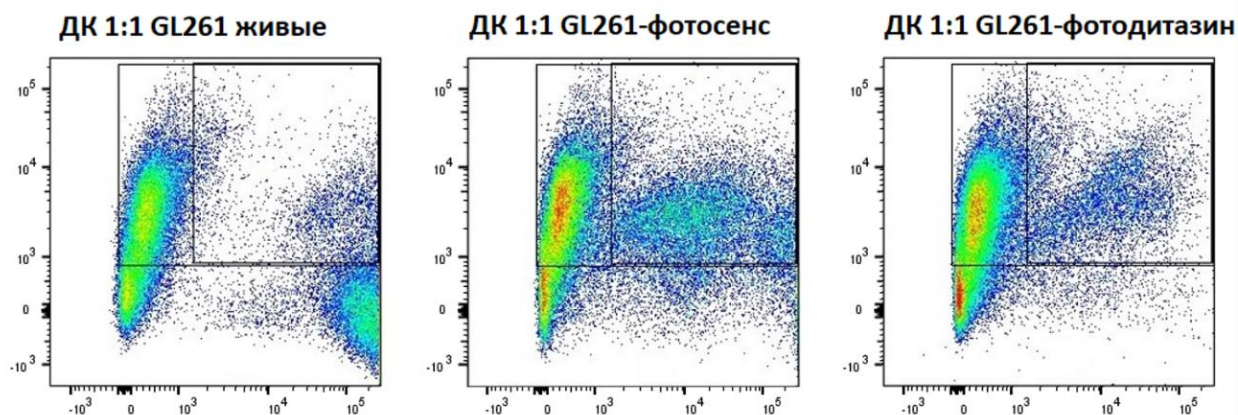


Рисунок 4. Диаграммы цитофлуорометрии с окрашенными дендритными клетками на специфический маркер дифференцировки CD11c и окрашенными опухолевыми в соотношении 1:5. По оси ОУ – интенсивность флуоресценции CD11c - PE-A, окрашена популяция дендритных клеток, по оси ОХ – Cell Tracker Green-CMFD, окрашена популяция целевых клеток

увеличением соотношения дендритных клеток к целевым фотоактивированным клеткам фагоцитирующая активность антигенпрезентирующих клеток увеличивается.

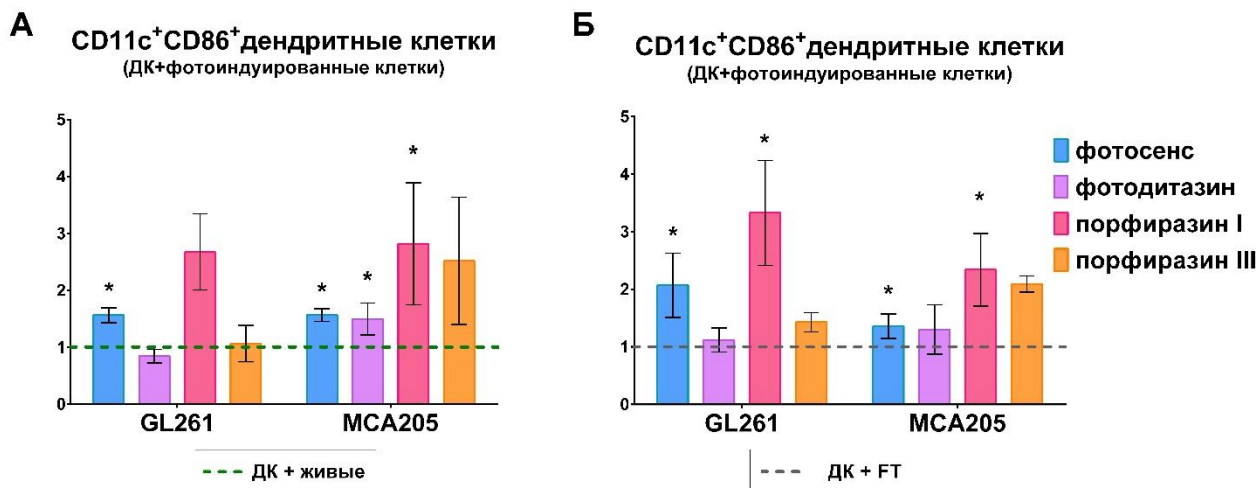


Рисунок 5. Коэффициент созревания на основе анализа CD11+CD86+ популяции дендритных клеток после сокультивирования с фотоактивированными опухолевыми клетками глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205. Значения представлены кратным увеличением по сравнению с дендритными клетками, сокультивированными с живыми опухолевыми клетками (А) или клетками, убитыми циклами замораживания, оттаивания (Б). $n \geq 3$, * - $p < 0.05$, t-тест Уэлча

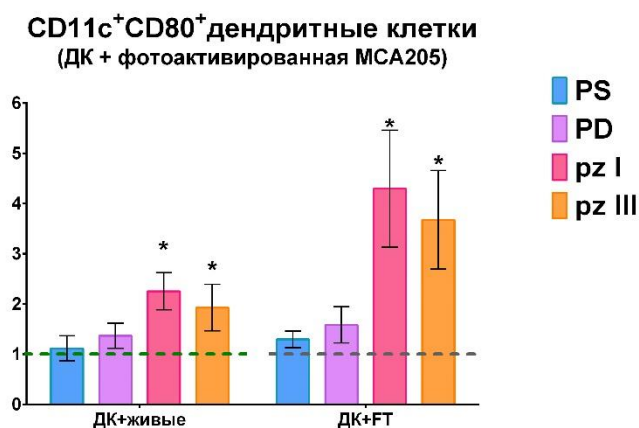


Рисунок 6. Коэффициент созревания на основе анализа CD11+CD80+ популяции дендритных клеток после сокультивирования с фотоактивированными клетками MCA205. Значения представлены кратным увеличением по сравнению с группами ДК+живые или ДК+ФТ. $n \geq 3$, * - $p < 0.05$, t-тест Уэлча. PS – фотосенс, PD – фотодитазин, pz I – порфиразин I, pz III – порфиразин III

Через 24 часа дендритные клетки активируются, что фенотипически отражается в экспрессии маркеров дифференцировки CD40, CD80, CD86 и молекулы гистосовместимости II класса (МНС II). Процесс кросспрезентации запускает цитотоксический противоопухолевый механизм, который представляет собой созревание CD8⁺T-клеток. В результате анализа фенотипического статуса антигенпрезентирующих клеток после взаимодействия с фотоиндуцированными опухолевыми клетками показано увеличение маркера дифференцировки CD86 (Рис. 5). Помимо этого, для клеточной линии MCA205 оценено количество поверхностного CD40 и CD80. Для соединений фотосенс и фотодитазин на двух клеточных линиях показана активация CD40, запускающего активацию Т-клеточных популяций. Для порфиразинов I и III характерна индукция активирующего пути дифференцировки CD8⁺T-лимфоцитов и CD4⁺T-лимфоцитов, что показано как увеличение количества ко-стимулирующей молекулы CD80 на поверхности дендритных клеток (Рис. 6).

IL-6

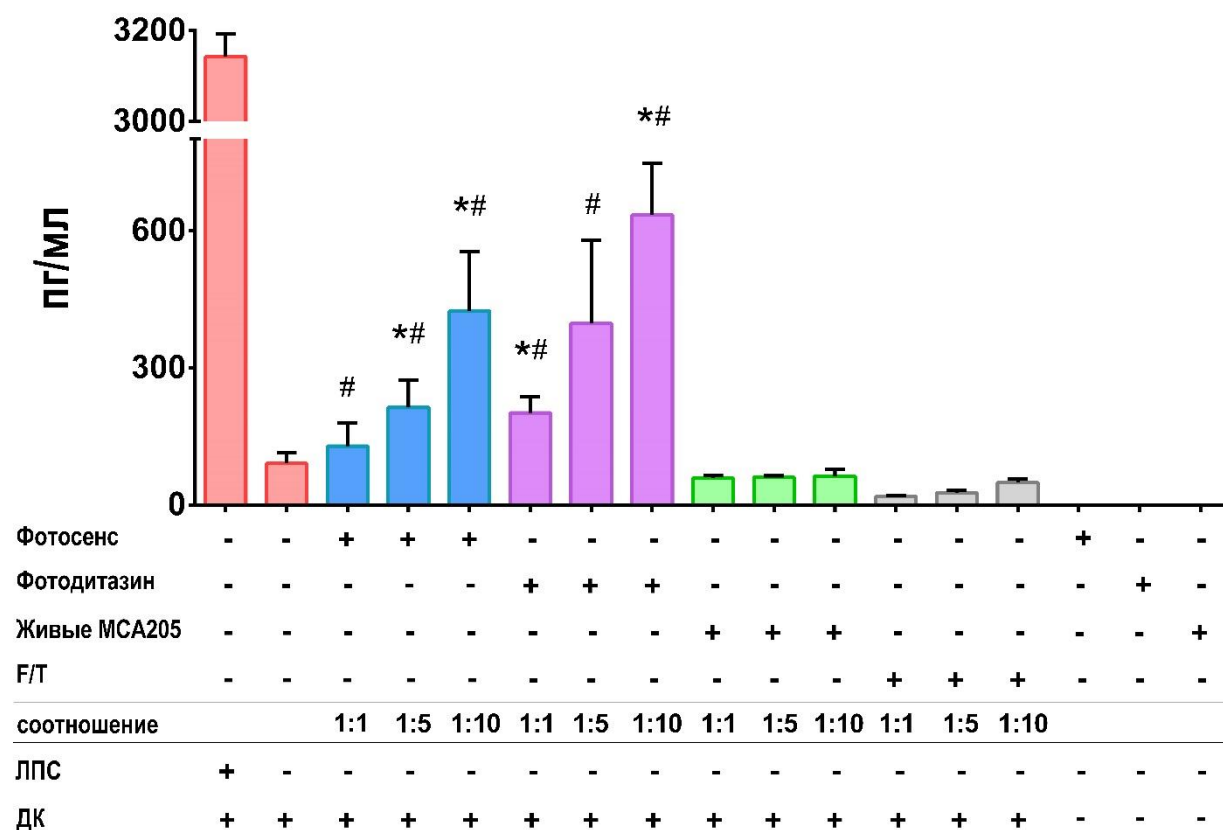


Рисунок 7. Количество секретируемого IL-6 дендритными клетками, сокультивированными в разных соотношениях с опухолевыми клетками, сокультивированными с индуцированными фотодинамической терапией клетками фибросаркомы в соотношении 1:1, 1:5 и 1:10. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, $n \geq 4$, * - $p = 0,01$, t-тест с поправкой Бонферрони

Анализ высвобождения интерлейкинов антигенпрезентирующими клетками

Показано, что в экспериментах по сокультивированию дендритных клеток с умирающими клетками фибросаркомы антигенпрезентирующие клетки высвобождают провоспалительный интерлейкин 6 (Рис. 7). Высвобождение IL-6 способствует развитию местной воспалительной реакции, а также активации незрелых дендритных клеток путем активации соответствующих рецепторов (TLR4 и P2RX7) на их поверхности. Затем происходит процессинг фагоцитированных опухолевых антигенов и их презентация зрелыми дендритными клетками для наивных Т-лимфоцитов, что приводит к активации Т-клеточного ответа. В дальнейшем происходит миграция эффекторных клеток к опухоли, инфильтрация опухоли Т-клетками, распознавание опухолевых клеток Т-лимфоцитами и их уничтожение.

Активация адаптивной иммунной системы в экспериментах *in vivo*

В экспериментах *in vivo* исследовалась роль адаптивного иммунитета в механизме защиты от опухоли. На модели профилактической

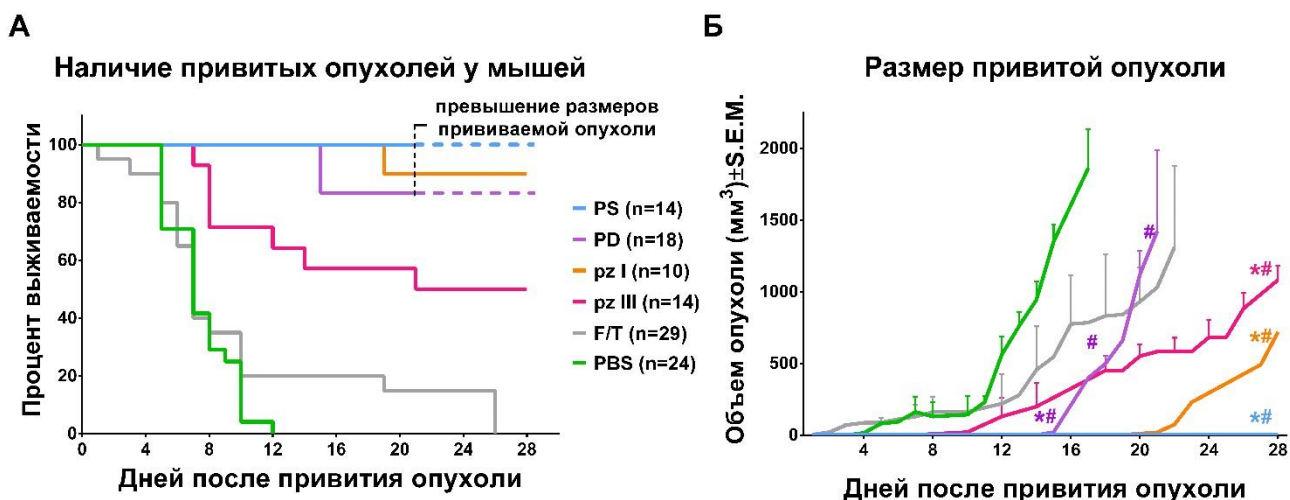


Рисунок 8. Вакцинация мышей умирающими фотоиндуцированными клетками фибросаркомы MCA205. **А** – кривая Каплана-Мейера иллюстрирует наличие у мышей опухоли на прививаемой стороне после вакцинации фотоактивированными умирающими клетками. Результаты представлены проентом мышей, не имеющих опухоли на прививаемой стороне. *,# - $p < 0,01$, логарифмический критерий Мантеля-Кокса. **Б** – размер прививаемой опухоли после вакцинации. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. *,# - $p < 0,05$, * - статистически значимое отличие от группы PBS, # - статистически значимое отличие от группы F/T, критерий Уилкоксона

противоопухолевой вакцинации показано, что умирающие клетки защищают от образования и роста опухоли, при этом активируя адаптивный противоопухолевый иммунитет (Humeau et al., 2019).

При действии фотосенса на опухолевые клетки вакцина оказывала 100% протективный эффект и прививаемая опухоль не развивалась. В случае эксперимента с фотодитазином 80% мышей были защищены от опухолевого роста (Рис. 8).

Порфиразин III показал иммуногенный характер клеточной смерти и 90% мышей были защищены от развития опухолевого очага.

Проведение вакцинации фотоиндуцированными клетками фибросаркомы MCA205 иммунодефицитных мышей линии Nude подтвердило значимый вклад адаптивной иммунной системы в реализации противоопухолевого ответа (Рис. 9). Рост опухоли в области инъекции жизнеспособных опухолевых клеток наблюдался во всех экспериментальных группах в 100% случаях. При этом развитие опухолевого процесса было более интенсивным, чем у иммунокомпетентных животных.

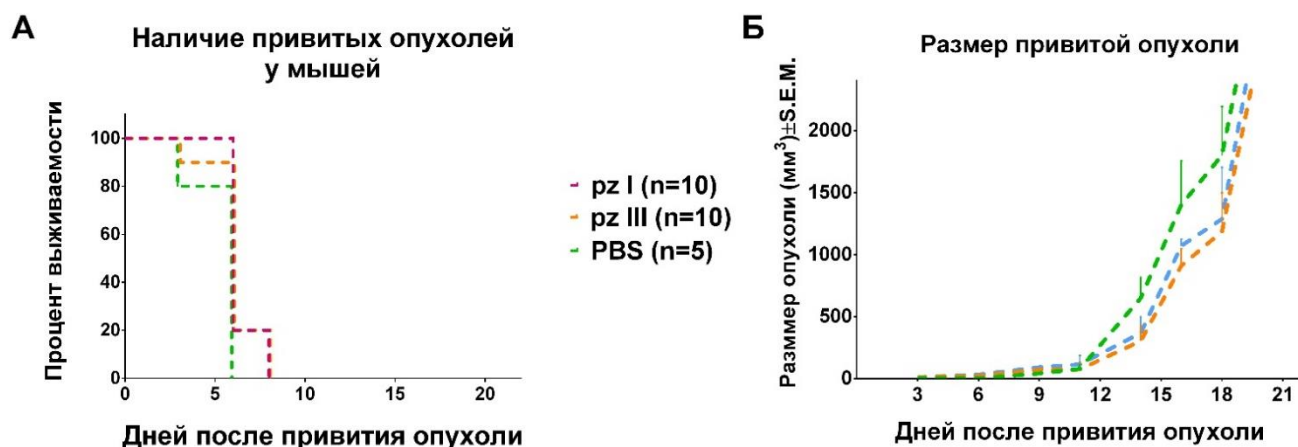


Рисунок 9. Вакцинация мышей линии Nude умирающими клетками фибросаркомы MCA205, индуцированными фотодинамической терапией на основе порфиразинов I и III. . **А** – кривая Каплана-Мейера иллюстрирует наличие у мышей опухоли на прививаемой стороне после вакцинации фотоактивированными умирающими клетками. Результаты представлены проентом мышей, не имеющих опухоли на прививаемой стороне. *,# - $p < 0,01$, логарифмический критерий Мантеля-Кокса. **Б** – размер прививаемой опухоли после вакцинации. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. *,# - $p < 0,05$, * - статистически значимое отличие от группы PBS, # - статистически значимое отличие от группы F/T, критерий Уилкоксона

Иммунизация животных умирающими фотоиндуцированными клетками против развития глиомы головного мозга in vivo

Наиболее выраженные иммуногенные свойства в эксперименте *in vivo* с использованием клеток фибросаркомы мыши MCA205 проявил фотосенсибилизатор фотосенс. Также *in vitro* фотоактивация фотосенса вызывала высвобождение DAMPs, индукцию фагоцитарной активности дендритных клеток и их фенотипическое созревание. С использованием этого фотоагента была апробирована модель профилактической вакцинации от глиомы мыши GL261.

Двойная иммунизация самок мышей линии C57BL/6J 6-8- недель фотоиндуцированными клетками глиомы линии GL261 приводила к активации противоопухолевой защиты у 100% мышей при последующей инъекции живых опухолевых клеток подкожно (Рис. 10). Также показано, что

однократное введение вакцины на основе фотоактивированных клеток не вызывало активации противоопухолевой защиты.

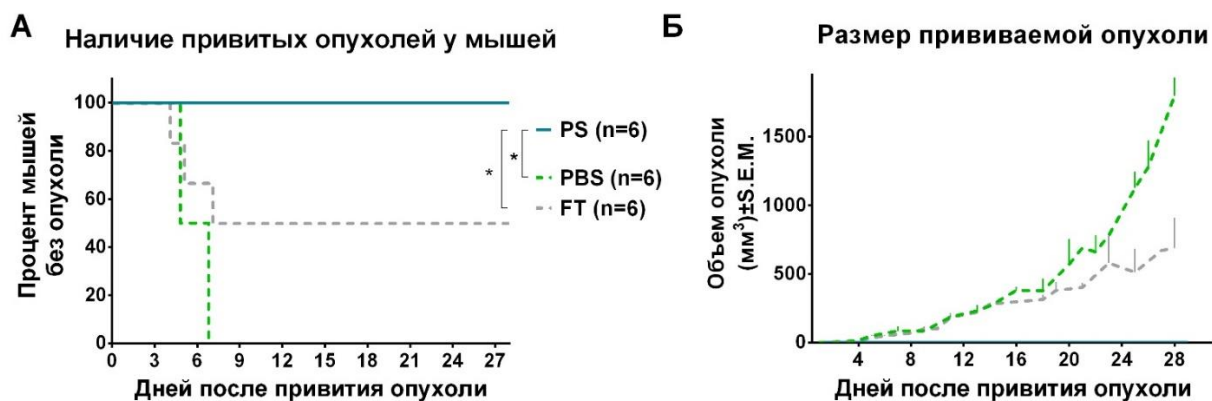


Рисунок 10. Двойная иммунизация мышей умирающими клетками глиомы GL261, индуцированными фотодинамической терапией на основе фотосенса (PS). FT – клетки, подвергшиеся циклам замораживания/оттаивания. А – кривая Каплана-Мейера иллюстрирует наличие у мышей опухоли на прививаемой стороне после двойной вакцинации умирающими клетками. Результаты представлены процентом мышей, не имеющих опухоли на прививаемой стороне. * $p < 0,01$, логарифмический критерий Манталя-Кокса. Б – размер прививаемой опухоли после вакцинации. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего

Моделирование профилактической противоопухолевой вакцинации дендритноклеточной вакциной *in vivo*

Активированные *in vitro* дендритные клетки выступают в качестве мощного стимула для активации Т-клеточных популяций *in vivo* в модели противоопухолевой вакцинации от глиомы головного мозга (Garg et al., 2016).

Вакцина на основе активированных дендритных клеток дважды вводилась животному для эффективной иммунизации. Развитие опухолевого очага в головном мозге моделировалось

введением по стереотаксическим координатам суспензии живых опухолевых клеток. В результате использования дендритной вакцины на основе фотоиндуцированных фотосенсом клеток,

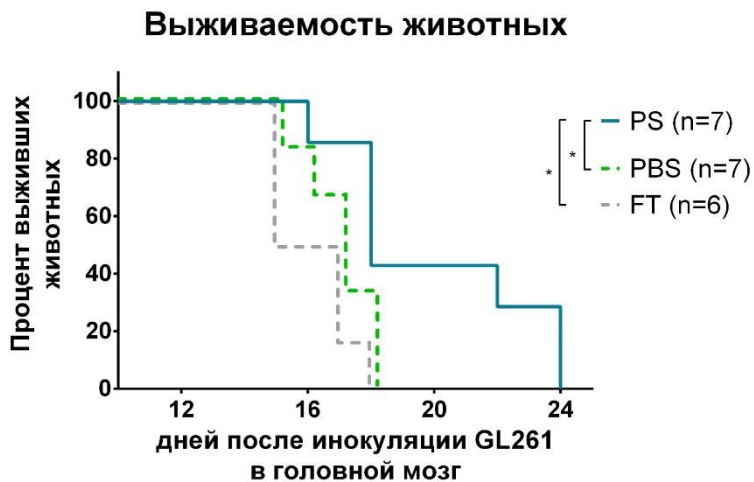


Рисунок 11. Вакцинация мышей дендритноклеточной вакциной на основе умирающих фотоактивированных фотосенсом клеток (PS). FT – применение дендритноклеточной вакцины на основе некротически-погибших клеток глиомы. Кривая Каплана-Мейера иллюстрирует выживаемость мышей в эксперименте. Результаты представлены процентом выживших животных. * - $p < 0,05$, логарифмический критерий Манталя-Кокса

умирающих по иммуногенному пути, показано, что выживаемость мышей значительно выше в сравнении с не иммунизированными животными (Рис. 11).

При визуализации опухолевого очага животных магнитно-резонансной томографией показано, что к 11 дню после инокуляции клеток глиомы GL261 в головной мозг мыши всех экспериментальных групп имели опухоль размером от 0,41 до 0,63 см³ без выраженного некротического очага. К 18 дню после инокуляции опухоли контрольных животных в 1,3 раза превысили объем опухолей иммунизированных животных из группы «PS» (фотосенс) и составил 1,04±0,55 см³. При этом у мышей из группы негативного неиммуногенного контроля (FT) опухоли развились до объема 1,34±0,55 см³, сильно деформируя черепную коробку, углубляясь к обонятельному тракту, нарушая сосудистую сеть. Также наблюдалась обширная зона некроза в области брегмы (Рис. 12).

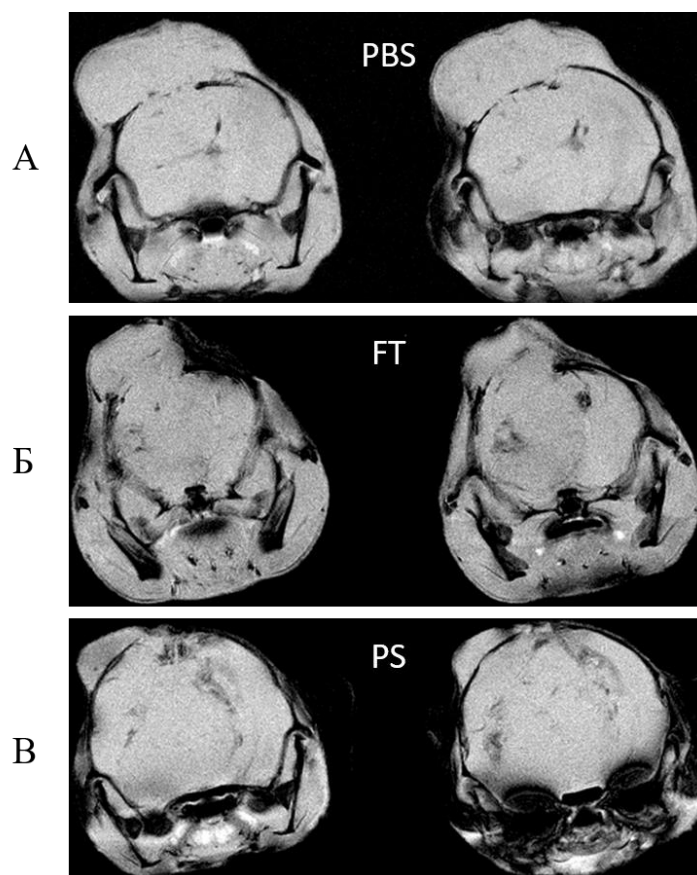


Рисунок 12. Репрезентативные томографическое изображение фронтальных срезов головного мозга мыши с развитым опухолевым очагом (18 день после инокуляции), перенесшей прививку умирающих фотоиндуцированных фотосенсом опухолевых клеток. А – неиммунизированная мышь; Б – животное, привитое дендритноклеточной вакциной на основе клеток, подвергшихся замораживанию/оттаиванию; В – вакцинированное животное дендритноклеточной вакциной на основе иммуногенно-погибающих клеток глиомы. TR=1000 мс, FOV – 20x20 мм, толщина среза – 1 мм

При оценке динамики неврологического дефицита было показано, что все животные после инокуляции опухолевых клеток до 9 дня имели легкую

степень выраженности очаговой неврологической симптоматики, но к 12 дню наблюдалось умеренной степени тяжести поражение у неиммунизированных мышей. Значительная разница в неврологическом статусе иммунизированных животных зафиксирована на 18 день эксперимента по сравнению с группой контроля «PBS», при этом только к 22 дню у животных группы «PS» фиксировалась умеренная неврологическая симптоматика (Рис. 13).

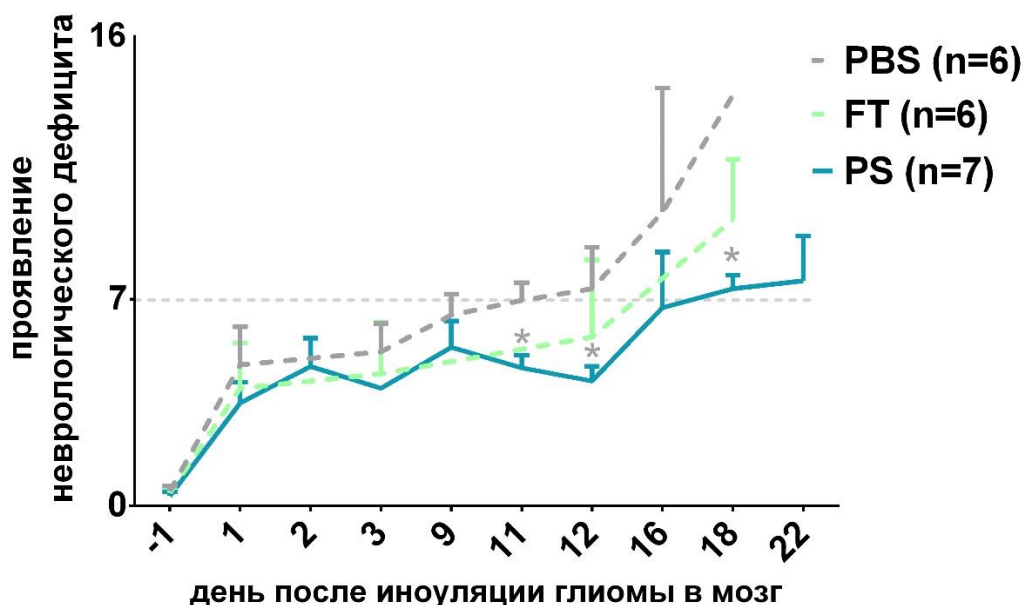


Рисунок 13. Изменение неврологического статуса мышей по шкале неврологического дефицита, вакцинированных дендритноклеточной вакциной на основе иммуногенно-погибающих клеток глиомы GL261 (PS) после иммунизации. FT – применение дендритноклеточной вакцины на основе некротически-погибших клеток глиомы. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,01$, статистически значимое отличие от группы PBS, критерий Уилкоксона

Таким образом, профилактическая вакцинация от глиомы головного мозга с использованием дендритноклеточной вакцины на основе фотоактивированных фотосенсом клеток глиомы показала эффективность в активации противоопухолевых иммунных процессов, увеличила выживаемость животных в эксперименте, привела к меньшему проявлению симптомов неврологического дефицита и вызвала развитие меньшего по объему опухолевого очага в сравнении с контрольными группами. Это свидетельствует о иммуногенности гибели опухолевых клеток после фотодинамического воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованные в работе фотосенсибилизаторы (фотосенс, фотодитазин, порфиразин I и порфиразин III) активируют регулируемые формы клеточной гибели клеток фибросаркомы MCA205 и глиомы GL261 вследствие развития фотодинамической реакции в отдельных компартментах клетки. Фотоиндуцированные клетки глиомы мыши GL261 и фибросаркомы MCA205 при использовании выбранных фотосенсибилизаторов в совокупности с фотодинамической терапией экспонируют на поверхности мембраны ранний маркер иммуногенной клеточной смерти кальретикулин, высвобождают свободный АТФ, а также испускают HMGB1 во внеклеточную среду после индукции.

Важнейшим преимуществом терапии с индукцией иммуногенной клеточной смерти является не прямое воздействие на организм. Не исключая своей таргетности иммуногенная клеточная смерть позволяет активировать иммунные силы организма против опухолевого очага. Опухолевые фотоиндуцированные клетки являются мощными стимулятором фагоцитирующей активности антигенпрезентирующих клеток и обеспечивают их фенотипическое созревание. Экспонирование маркеров дифференцировки CD86, CD80 и CD40 доказывает возможность кросс-презентации опухолевого антигена Т-клеточному иммунитету. Помимо этого, антигенпрезентирующие клетки вследствие взаимодействия с фотоиндуцированными умирающими/мертвыми опухолевыми клетками испускают провоспалительный цитокин IL6.

Показан противоопухолевый эффект вакцинации на основе всех исследуемых фотосенсибилизаторов на модели *in vivo*. На линии иммунокомпетентных мышей доказана эффективность вакцины на основе умирающих клеток фибросаркомы мыши после ФДТ воздействия. На иммунодефицитных животных доказано, что фотодинамическое воздействие с применением выбранных фотосенсибилизаторов активирует противоопухолевый адаптивный иммунитет *in vivo*.

В модели дендритноклеточной вакцинации против глиомы головного мозга и в сингенной модели глиомы показаны противоопухолевые эффекты вакцин на основе фотоактивированных фотосенсом клеток. Активация иммуногенной клеточной смерти приводила к значительному повышению выживаемости животных в эксперименте, к меньшему проявлению симптомов очагового неврологического дефицита и меньшему развитию объема опухолевого очага в головном мозге мышей.

Проведенные *in vitro* и *in vivo* исследования показали, что индукция смерти опухолевых клеток посредством фотодинамического воздействия с применением фотосенса, фотодитазина, порфиразина I и порфиразина III активирует противоопухолевый адаптивный иммунный ответ.

ВЫВОДЫ:

1. Локализация фотосенсибилизаторов (фотосенс, фотодитазин, порфиразин I и порфиразин III) в клетках глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205 ассоциируется с регулируемые формами клеточной смерти вследствие фотодинамического воздействия;
2. Фотодинамическое воздействие с применением исследуемых фотосенсибилизаторов вызывает высвобождение ключевых DAMPs опухолевыми клетками, что свидетельствует о иммуногенном характере клеточной смерти;
3. Клетки глиомы GL261 и фибросаркомы MCA205, индуцированные фотодинамической терапией с применением фотосенсибилизаторов фотосенс и фотодитазин, порфиразин I и порфиразин III, эффективно фагоцитируются антигенпрезентирующими клетками и обеспечивают их фенотипическое созревание;
4. Умирающие опухолевые клетки, подверженные воздействию фотодинамической терапии с применением исследуемых фотоагентов, в модели профилактической противоопухолевой вакцинации защищают от образования и роста опухоли, активируя адаптивный противоопухолевый иммунитет.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Turubanova, V. D.**, Balalaeva, I. V., Mishchenko, T. A., Catanzaro, E., Alzeibak, R., Peskova, N. N., Efimova, I., Bachert, C., Mitroshina, E. V., Krysko, O., Vedunova, M. V., & Krysko, D. V. Immunogenic cell death induced by a new photodynamic therapy based on photosens and photodithazine // Journal for immunotherapy of cancer. 2019. V. 7, N. 1. P. 350. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0826-3>
2. Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., **Турубанова В.Д.**, Альзеибак Р., Балалаева И.В., Ведунова М.В., Krysko D.V. Сравнительный анализ действия фотосенсибилизаторов фотосенс, фотодитазин и гипериперин на клетки глиомы и первичные нейрональные культуры in vitro // Соврем. технол. мед. 2019. №4. <http://stm-journal.ru/ru/numbers/2019/4/1588>
3. Mishchenko, T. A., **Turubanova, V. D.**, Mitroshina, E. V., Alzeibak, R., Peskova, N. N., Lermontova, S. A., Klapshina, L. G., Balalaeva, I. V., Vedunova, M. V., & Krysko, D. V. Effect of novel porphyrazine photosensitizers on normal and tumor brain cells // Journal of biophotonics. 2020. V. 13, N. 1. e201960077. <https://doi.org/10.1002/jbio.201960077>
4. Efimova, I., Catanzaro, E., Van der Meeren, L., **Turubanova, V. D.**, Hammad, H., Mishchenko, T. A., Vedunova, M. V., Fimognari, C., Bachert, C., Coppieters, F., Lefever, S., Skirtach, A. G., Krysko, O., & Krysko, D. V. Vaccination with early ferroptotic cancer cells induces efficient antitumor immunity // Journal for immunotherapy of cancer. 2020. V.8, N. 2. e001369. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001369>
5. **Turubanova V.D.**, Mishchenko T.A., Balalaeva I.V., Efimova I., Peskova, N. N., Lermontova, S. A., Klapshina, L. G., Bachert, C., Krysko, O., Vedunova, M. V., & Krysko, D. Novel porphyrazine-based photodynamic anti-cancer therapy induces immunogenic cell death // Sci Rep. 2021. V. 11, N. 7205. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86354-4>

Материалы конференций:

6. **Турубанова В.Д.**, Ведунова М.В. Анализ типа клеточной смерти, индуцируемой фотодинамической терапией с применением фотосинтетического агента Фотосенс, на клетках глиомы головного мозга линии Gl-261 // Сборник тезисов Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019». М: МАКС Пресс, 2019. ISBN 978-5-317-06100-5
7. Альзеибак Р., Пескова Н.Н., **Турубанова В.Д.**, Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Балалаева И.В., Крысько Д.В. Сравнительный анализ гибели клеток глиомы при фотодинамическом воздействии с фотосенсибилизаторами разной природы // Сборник тезисов 23-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА». 2019. С. 395-396.

8. Mishchenko T.A., **Turubanova V.D.**, Alzeibak R., Peskova N.N., Balalaeva I.V., Mitroshina E.V., Vedunova M.V., Krysko D.V. Features of glioma cell death under photodynamic treatment with different types of photosensitizers // Материалы международной конференции «7th OncoPoint Symposium». 2019. С. 59.

9. **Turubanova V.D.**, Efimova Ju., Mishchenko T.A., Balalaeva I.V., Mitroshina E.V., Vedunova M.V., Krysko D.V. Induction of immunogenic cell death in glioma by photodynamic therapy // Материалы международной конференции «7th OncoPoint Symposium». 2019. С. 64.

10. **Турубанова В.Д.**, Ефимова Ю.В., Мищенко Т.А., Балалаева И.В., Ведунова М.В., Крысько Д.В. Иммуногенные пути контролируемой смерти клеток при терапии нейроонкологических заболеваний // Материалы XV международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». 2019. С. 415.

11. Альзеибак Р., Пескова Н.Н., **Турубанова В.Д.**, Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Крысько Д.В., Балалаева И.В. Фотоиндуцированная гибель клеток глиомы при использовании ряда фотосенсибилизирующих соединений // Тезисы докладов 72-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2019. С. 25 (РИНЦ, eLIBRARY ID: 42421100)

12. **Турубанова В.Д.**, Ефимова Ю.В., Мищенко Т.А., Балалаева И.В., Ведунова М.В., Крысько Д.В. Индуцируемые фотодинамической терапией иммуногенные пути контролируемой смерти клеток при нейроонкологических заболеваниях. Тезисы докладов 72-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», С. 226 (год публикации - 2019) (РИНЦ, eLIBRARY ID: 41173441)

13. **Турубанова В.Д.**, Ефимова Ю.В., Мищенко Т.А., Балалаева И.В., Ведунова М.В., Крысько Д.В. Индуцируемые фотодинамическим воздействием иммуногенные пути клеточной гибели при нейроонкологических заболеваниях // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России. 2019. Т.2. С. 81-82.

14. **Турубанова В.Д.**, Ефимова Ю.В., Балалаева И.В., Мищенко Т.А., Савюк М.О., Ведунова М.В., Крысько Д.В. Индуцируемые фотодинамической терапией с применением порфиразинов иммуногенные пути гибели опухолевых клеток головного мозга // Материалы XVI международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». 2020. С. 464-465.

15. **Турубанова В. Д.**, Ефимова Ю. В., Балалаева И. В., Мищенко Т. А., Савюк М. О., Ведунова М. В., Крысько Д. В. Иммуногенные пути гибели опухолевых клеток, индуцируемые фотодинамической терапией с применением новых фотоагентов на основе порфиразинов // Сборник материалов к VII Международной конференции молодых ученых:

биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2020: сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск: ИПЦ НГУ. 2020. С. 574-576.

16. **Турубанова В. Д.**, Балалаева И., Альзеибак Р., Пескова Н., Митрошина Е., Мищенко Т., Ведунова М., Крысько Д. Индуцируемые фотодинамической терапией иммуногенные пути клеточной гибели опухолевых клеток // Материалы докладов Молодежной конференции “XXI Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии”. 2020. С.214-215. ISBN 978-5-86763-440-7

17. Mishchenko T., **Turubanova V.**, Balalaeva I., Efimova Iu, Peskova N., Klapshina L., Lermontova S., Bachert C., Krysko O., Vedunova M., Krysko D. New photosensitizers from tetra(aryl)tetracyanoporphyrazines group can induce immunogenic cell death // Материалы международной конференции «14th digital World Immune Regulation Meeting» (WIRM 2020). 2020. P.61. Abstract no P.64.

18. **Турубанова В.Д.**, Ефимова Ю.В., Савюк. М.О., Балалаева И.В., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Крысько Д.В. Фотодинамически-индуцируемая иммуногенная клеточная смерть опухолевых клеток, основанная на новых фотосенсибилизаторах из группы тетра(арил)тетрацианопорфиразинов // Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2020. С. 209.

19. **Турубанова В.Д.**, Ефимова Ю.В., Балалаева И.В., Мищенко Т.А., Савюк М.О., Ведунова М.В. и Крысько Д.В Иммуногенные пути смерти опухолевых клеток при воздействии новых фотосенсибилизирующих агентов // Сборник статей 25 Нижегородской сессии молодых ученых. 2020. С. 215-218.

20. Лопатенко М.В., **Турубанова В.Д.**, Ведунова М.В. и Крысько Д.В. анализ изменений транскриптома дендритных клеток при активации иммуногенной клеточной смерти в клетках глиомы GL261 // Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2020. С. 125.

21. **Турубанова В.Д.**, Ефимова Ю.В., Балалаева И.В., Мищенко Т.А., Савюк М.О., Ведунова М.В. и Крысько Д.В. Иммуногенные пути смерти опухолевых клеток при воздействии новых фотосенсибилизирующих агентов // Сборник тезисов VII Всероссийского молодежного научного форума с международным участием «OpenScience 2020». 2020. С.101

22. Альзеибак Р., Пескова Н.Н., Горохова А.А., **Турубанова В.Д.**, Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Крысько Д.В., Балалаева И.В. Сравнительный анализ гибели опухолевых клеток разного происхождения при фотодинамическом воздействии фотосенса и фотодитазина // Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2020. С. 15.

23. Альзеибак Р., Пескова Н.Н., Горохова А.А., **Турубанова В.Д.**, Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Балалаева И.В., Крысько Д.В. Сравнение эффективности фотосенса и фотодитазина в отношении опухолевых клеток разного происхождения // Сборник тезисов 24-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – Наука XXI века». Пущино, 2020. С. 294.