

Дружкова Ирина Николаевна

**Флуоресцентный имиджинг с генетически кодируемым сенсором SupHer2 в
исследовании рН цитозоля опухолевых клеток
in vitro и *in vivo***

1.5.2 — биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2021

Работа выполнена на кафедре патологической анатомии и на базе научной лаборатории флюоресцентного биоимиджинга научно-исследовательского института экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Загайнова Елена Вадимовна

Доктор медицинских наук наук

Член-корреспондент Российской академии наук

ректор ФГАОУ ВО "Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского" (ННГУ)

Официальные оппоненты:

Генина Элина Алексеевна

доктор физико-математических наук, профессор кафедры оптики и биофотоники института физики ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Якубовская Марианна Геннадиевна

доктор медицинских наук, заведующая отделом химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Ведущая организация:

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита диссертации состоится «23» сентября 2021 в 15:00 на заседании диссертационного совета при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23, корпус 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского и на сайте <https://diss.unn.ru/files/2021/1145/diss-Druzhkova-1145.pdf>.

Автореферат разослан « » _____ 2021 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
Кандидат биологических наук

Акинчиц Елена Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Известно, что внутриклеточный рН (рНс) опухолевых клеток является более щелочным, по сравнению с нормальными клетками организма (7.12-7.65 при норме 6.99-7.2), а внеклеточный рН (рНе) опухоли более кислый (6.2-6.9 при норме 7.3-7.4) (*Webb et al., 2011; Damaghi et al., 2013*). Предполагается, что более низкое значение рНе является причиной миграции и инвазии опухолевых клеток, а более щелочное значение рН в цитоплазме опухолевых клеток стимулирует клеточную пролиферацию и препятствует апоптозу.

Более того, эффект множественной лекарственной устойчивости ассоциирован с нарушением градиента рН в опухолевых тканях (*Rauch et al., 2009*). Кислый внеклеточный рН может значительно затруднять прохождение препаратов через плазматическую мембрану, что приводит к уменьшению накопления препарата в клетке. Поскольку многие из препаратов представляют собой слабые основания, существует вероятность их прямого протонирования и нейтрализации еще вне клетки в кислой межклеточной среде. Другой механизм хеморезистентности заключается в нарушении градиента рН на мембранах клеточных органелл (лизосом, эндосом, аппарата Гольджи, секреторных везикул), где также может происходить нейтрализация лекарства.

В частности, было показано, что в опухолевых клетках устойчивых к цисплатину внутриклеточный рН заметно повышен (*Huang et al., 2005; Chau et al. 1999; Murakami et al., 2001*). Одним из возможных механизмов защелачивания цитоплазмы клеток, устойчивых к цисплатину, считается повышенная экспрессия вакуолярной АТФазы (V-ATPase). Было показано, что супрессия V-ATPase ведет к быстрому закислению цитоплазмы и существенному увеличению чувствительности к цисплатину *in vitro* (*Murakami et al., 2001; Kulshrestha et al., 2016*) и *in vivo* (*Luciani et al., 2004*).

Однако изучению внутриклеточного рНс уделяется мало внимания, поскольку отсутствуют адекватные методы его измерения. Существующие методы прижизненного измерения рНс либо инвазивны (например, использование микроэлектродов), либо крайне сложны и дорогостоящи (ПЭТ, МРТ). Поэтому в настоящее время активно развиваются подходы к анализу рН оптическими методами. Их существенным недостатком является необходимость экзогенного введения в клетку или ткань флуоресцентного зонда, чувствительного к рН. Флуоресцентный зонд, как правило, представляет собой химически синтезированное вещество, оптические характеристики которого сильно меняются при связывании с белками или иными компонентами клетки, а внутриклеточное распределение непостоянно. Использование таких зондов ограничено исследованиями *in vitro*, поскольку их доставка в клетки солидной опухоли проблематична.

Перспективным инструментом для анализа внутриклеточного рН в опухолях *in vivo* могут стать генетически кодируемые сенсоры на основе GFP-подобных белков. Данные сенсоры могут экспрессироваться в любом клеточном компартменте в зависимости от целей исследования и не оказывают влияния на внутриклеточные процессы. В связи с этим актуальной задачей является разработка методик анализа флуоресценции сенсора в различных опухолевых моделях, как *in vitro*, так и *in vivo*, и получение с их помощью новых данных как о рНс опухолевых клеток в норме и при различных воздействиях.

Цели и задачи

Целью работы было изучение рН цитозоля опухолевых клеток при взаимодействии со стромальными клетками, при естественном росте опухоли (*in vivo*), под влиянием химиотерапевтических препаратов (*in vitro, in vivo*).

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Разработать методики регистрации рН цитозоля опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* с использованием генетически-кодированного сенсора и систем флуоресцентного имиджинга.
2. Изучить изменение рН цитозоля опухолевых и стромальных клеток при их взаимодействии.
3. Изучить рН цитозоля опухолевых клеток экспериментальных опухолей у животных при естественном росте опухоли.
4. Изучить изменение рН цитозоля опухолевых клеток при воздействии химиотерапевтических препаратов *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна

Впервые применен новый генетически-кодированный сенсор для изучения рН цитозоля опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*.

Впервые проведено исследование изменения рН цитозоля опухолевых клеток при воздействии химиотерапевтических препаратов *in vitro* и *in vivo*.

Предложена методика исследования рН цитозоля опухолевых клеток *in vivo*, получены данные о распределении зон с разными значениями рН цитозоля опухолевых клеток, данные сопоставлены с морфологической структурой опухоли. Новизна подтверждена патентом РФ № 2014142436 «Способ регистрации внутриклеточного рН опухолевых клеток».

Научно-практическая значимость работы

Разработанные методики регистрации флуоресценции генетически-кодированного сенсора *in vitro* и *in vivo* могут быть использованы для дальнейших исследований рН цитозоля опухолевых клеток при разработке новых видов противоопухолевого лечения.

Полученные результаты могут стать основой для разработки методов модификации внутриклеточного водородного показателя опухолевых клеток для повышения эффективности стандартной химиотерапии.

Основные выводы и результаты работы могут быть использованы при разработке соответствующих разделов спецкурсов и лекций по биомедицине, онкологии и биофизике. Работа может иметь практическую ценность для врачей-химиотерапевтов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанные методики регистрации внутриклеточного рН на основе генетически кодированного сенсора *SypHer2* и методов оптического имиджинга дают возможность анализировать рНс живых опухолевых клеток в моделях на разных уровнях организации: клеточный монослой и опухолевые сфероиды *in vitro* и подкожных опухолях *in vivo*.
2. Рост опухолевого узла сопровождается зональностью распределения значений рН цитозоля опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*.
3. Взаимодействие опухолевых и стромальных клеток сопровождается изменениями рНс как в опухолевых клетках, так и в фибробластах.

4. Изменения рН цитозоля опухолевых клеток при воздействии химиотерапевтических препаратов зависят от механизма действия препарата и отражают терапевтический эффект.

При воздействии химиотерапевтических препаратов *in vivo* наблюдается статистически значимое снижение рНс в случае цисплатина и тенденция к снижению без статистически значимых отличий в случае таксола, что коррелирует с терапевтическим эффектом.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, индексируемых Web of Science, Scopus, РИНЦ и определенных ВАК; 11 тезисов конференций; получен 1 патент.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертации были представлены и обсуждены на Международных конференциях (7 докладов): и Российских конференциях (2 доклада): International symposium “Topical problems of biophotonics – 2013, 2015”, VII Съезд Российского фотобиологического общества (пос. Шепси, 2014), Научно-практическая конференция с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к практике» (Москва, 2014), SPIE European conferences on biomedical optics 2015 (Германия, 2015), In vitro and in vivo investigation of pH tumor status using genetically encoded sensors and fluorescence imaging. SPIE. Photonics West 2015 BiOS (San Francisco, United States. 7-12 February 2015), Fluorescent imaging of tumor metabolic state. 3D International Conference on Biophotonics. (Italy, Florence, May 20-22 2015), Tumor and normal cells communication: fluorescence imaging and markers. 10th workshop and conference on advanced multiphoton and fluorescence lifetime imaging techniques FLIM2015 (Germany, Saarbrücken, June 17-19, 2015), AACR Special Conference on The function of tumor microenvironment in cancer progression (Сан-Диего, США, 7-10 января 2016), 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА» (18-22 апреля 2016).

Структура и объем диссертации.

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 109 страницах, содержит 33 рисунка и 2 таблицы. Список литературы содержит 192 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **главе 1** представлен обзор литературы, посвященный следующим основным темам: понятие водородного показателя и механизмы регуляции рН в клетке, особенности рН опухолевых клеток и тканей, значение рНс для проведения лекарственной терапии опухолей, ко-факторы НАД(Ф)Н и ФАД и их вклад в энергетический метаболизм клетки, краткое описание известных на сегодняшний день методов регистрации рНс и особая роль оптического метода.

В **главе 2** перечислены использованные в работе объекты исследований, реактивы и оборудование, описаны методики исследований.

Клетки карциномы шейки матки человека Hela Kyoto, трансфицированные геном флуоресцентного белка-сенсора, чувствительного к изменению рН - *SypHer2*. Культуры были получены в рамках совместных проектов в лаборатории Белоусова В.В. в Институте

биоорганической химии РАН, г. Москва. Клетки рутинно культивировали в среде ДМЕМ с 10% содержанием бычьей сыворотки в стандартных условиях культивирования при 37°C и влажности 80%, в атмосфере с 5% содержанием CO₂. Субкультивирование производили при достижении клеточным монослоем 80% конфлюентности. Для регистрации флуоресценции клетки помещали на чашку для флуоресценции со стеклянным дном.

Опухолевые сфероиды. Трехмерные клеточные культуры формировали в 96-луночных ультранизкоадгезивных планшетах с круглым дном, плотность посева клеток составляла 350 клеток/100 мкл/лунку, затем планшет помещали на качалку и оставляли при 37°C и скорости 100 об/мин на 1.5 часа для формирования сфероидов. Методика была адаптирована из руководства производителя. По данным литературы трехмерные клеточные культуры более точно воспроизводят условия опухоли, формирующейся в организме, по сравнению с плоскими двумерными клеточными культурами и представляют собой модель опухоли до момента начала процессов ангиогенеза (*Evans et.al., 2011*).

Животные. Эксперименты выполнены на самках мышей линии nude, массой 20-22 г. Иммунодефицитные мыши содержались в SPF виварии в условиях повышенного контроля с 12-часовым световым режимом и свободном доступе к воде и пище. Всего использовано 24 животных. Модельные опухоли получали путем подкожной инъекции животным суспензии клеток, в фосфатно-буферном растворе в количестве 2,5 млн клеток. Каждому животному прививали по две опухоли в верхнюю часть бедра. При проведении исследований неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.). Исследования проводились с разрешения этического комитета (протокол № 1 заседания Этического Комитета НижГМА по проведению научных исследований с участием человека и животных в качестве объекта исследований от 11 января 2010). Перед проведением хирургических манипуляций животных наркотизировали путем внутримышечного введения раствора золетила (40 мг/кг) с добавлением рометара (10 мг/кг), общий объем вводимого раствора – 60 мкл.

Ex vivo образцы опухолей животных. После эвтаназии животных путем дислокации шейных позвонков опухоль забирали и моментально помещали в жидкий азот для сохранения флуоресценции сенсора. Затем опухоль помещали в специальную среду для замороженных образцов (O.C.T. compound) и с помощью криотома LeicaCV1900UV (Leica, Германия) получали криосрезы толщиной 20 мкм.

Генетически кодируемый сенсор. В работе использованы новый флуоресцентный генетически-кодируемый сенсор, чувствительный к изменениям pH - SypHer2, разработанный в Институте биоорганической химии РАН, г. Москва в рамках совместных проектов (*Matlashov et.al., 2015, Markvicheva, 2011*). Преимуществами генетически кодируемых сенсоров для регистрации внутриклеточного pH перед химическими красителями (типа BCECF, SNARF) являются: стабильная экспрессия и распределение сенсора в клетке, отсутствие необходимости введения дополнительных агентов, нетоксичность, радиометрический принцип регистрации сигнала, высокая чувствительность и специфичность в физиологическом диапазоне pH, возможность длительного мониторинга pH в живых клетках и тканях.

Сенсор SypHer2 создан на основе желтого флуоресцентного белка YFP (yellow fluorescent protein), представляет собой мономер. Белковая молекула сенсора имеет

структуру, типичную для белков семейства YFP. За чувствительность белка к рН отвечает хромофор, который может находиться в анионном или нейтральном состояниях. В зависимости от соотношения этих состояний меняются его флуоресцентные характеристики. Белок имеет два пика возбуждения на длине волны 420 нм и 500 нм и пик эмиссии на длине волны 516 нм. При изменении значения рН интенсивность флуоресценции на двух пиках меняется разнонаправленно, что позволяет не просто регистрировать интенсивность флуоресценции, а рассчитывать отношение интенсивности флуоресценции на одном пике к интенсивности флуоресценции на другом пике, т.е. проводить рациометрическое измерение (рис.1).

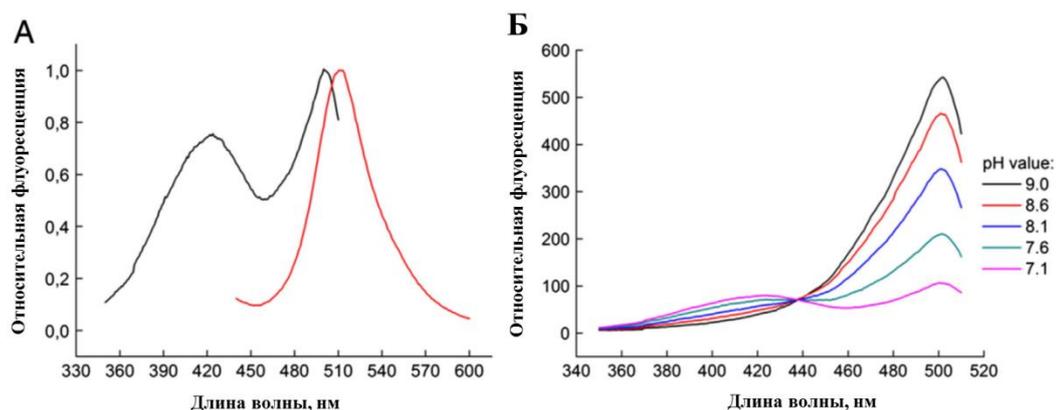


Рис. 1 Спектральные характеристики сенсора SypHer2: А – спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции, Б – Изменение пиков возбуждения флуоресценции в зависимости от значения внутриклеточного рН.

Системы флуоресцентного имиджинга. Для регистрации флуоресценции сенсора использовали системы флуоресцентного имиджинга:

- Для *in vitro* исследований – лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) LSM 880 (Carl Zeiss, Германия). Изображения строились с помощью водно-имерсионного объектива C-Apochromat W Corr с сорокакратным увеличением и числовой апертурой 1.2, что позволило получить поле зрения 213*213 микрон с разрешением 1024*1024 пиксела. В качестве источника возбуждающего излучения на длине волны 405 нм использовали диодный лазер, и для возбуждения флуоресценции на длине волны 488 нм – аргоновый лазер, регистрировали флуоресценцию в диапазоне от 435 нм до 550 нм.
- Для *ex vivo* образцов - инвертированный флуоресцентный микроскоп DM IL LED (Leica, Германия). Для возбуждения флуоресценции на длине волны 430 нм использовали фильтр CFP ET (Ex: BP 436/20, Em: BP 480/40), а для возбуждения флуоресценции на длине волны 500 нм – фильтр YFP ET (Ex: BP 500/20, Em: BP 535/30).
- Для *in vivo* исследований – установка для молекулярного флуоресцентного имиджинга IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences, США) на 10, 13, 17 и 20 день опухолевого роста. На основании характеристик сенсора были использованы соответствующие настройки для регистрации интенсивности

флуоресценции: возбуждение на $\lambda = 430$ нм и $\lambda = 500$ нм, регистрация сигнала на $\lambda = 540$ нм, время экспозиции 5 секунд, поле зрения - В.

Была разработана методика количественной обработки флуоресцентного сигнала с помощью программы EMBL ImageJ путем вычитания фона (сигнал в зоне свободной от клеток, либо вне мышцы) на каждом изображении и деления сигнала, полученного при возбуждении светом с длиной волны 488-500 на сигнал, полученный при возбуждении светом с длиной волны 405-430 нм. Получали результирующее изображение, на котором уровень сигнала в относительных единицах отражает уровень рН (рис. 2).

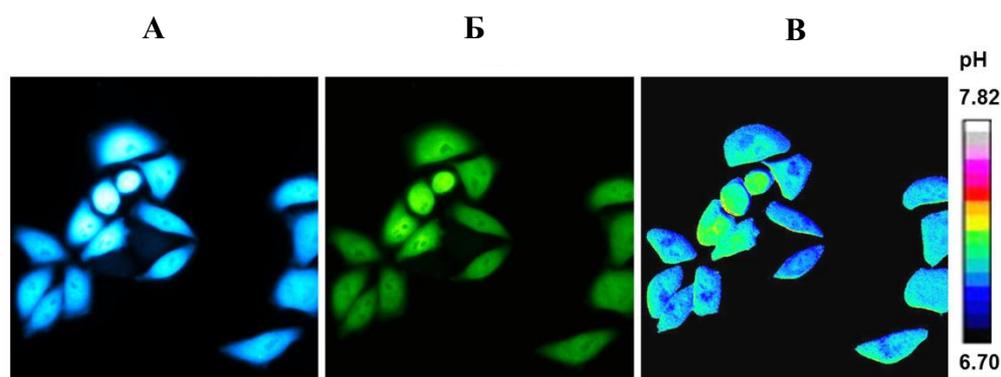


Рис. 2 Пример получения результирующего изображения сигнала сенсора SypHer2: А – флуоресценция сенсора при возбуждении светом с длиной волны 405 нм (I_{405}), Б – флуоресценция сенсора при возбуждении светом с длиной волны 488 нм (I_{488}), В – отношение интенсивностей флуоресценции (I_{488}/I_{405}). Микроскоп LSM-710, увеличение x400.

Предварительно была проведена калибровка сенсора SypHer2. Калибровку проводили в клетках с использованием буферов с высоким содержанием K^+ (130 мМ глюконата калия, 20 мМ глюконата натрия, 0.5 мМ $MgSO_4$, 0.2 мМ ЭД-ТА и 30 мМ Tris (рН 8.1 - 9.0) с добавлением HEPES в присутствии ионофоров 5 мкМ нигерицина и 5 мкМ монензина. Клетки инкубировали с каждым буфером не менее 3-4х минут для уравнивания внеклеточного и внутриклеточного рН. Далее регистрировали и обрабатывали сигнал по описанным выше методикам. Примеры флуоресцентных и результирующих изображений при разных значениях рН и калибровочная кривая представлены на рисунке 3.

Химиотерапевтическое воздействие in vitro. Для определения ИК50 цисплатина клетки помещали на 96 луночный планшет в концентрации 3×10^3 клеток на 100 мкл. Спустя 24 часа добавляли в ростовую среду препарат в концентрациях 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 мкМ и инкубировали в течение 48 часов, затем проводили МТТ-тест по описанной ниже методике. Эксперимент проводили в трех повторностях, на каждую концентрацию было использовано по 10 лунок 96-луночного планшета.

Далее при проведении экспериментов с химиотерапевтическим воздействием добавляли препарат в концентрации равной ИК50 для мономерной клеточной культуры и 2хИК50 – для трехмерной клеточной культуры.

Определение полумаксимальной ингибирующей концентрации проводили с помощью колориметрического теста (МТТ-теста) для оценки метаболической

активности клеток. В качестве красителя использовали жёлтый тетразол, который восстанавливается в пурпурный формазан только в живых клетках. В качестве растворителя использовали диметилсульфоксид. Оптическую плотность полученных проб измеряли с помощью многофункционального микропланшетного ридера (BioTek, Германия). Данные обрабатывали в программе MS Excel 2003.

Выявление мертвых клеток в экспериментах с химиотерапевтическим воздействием осуществляли с помощью флуоресцентного красителя пропидиума йодида, не способного проникать внутрь живых клеток, имеющих неповрежденную мембрану, и, таким образом селективно окрашивающих только мертвые клетки. Данный краситель имеет максимум возбуждения флуоресценции на длине волны 535 нм и максимум эмиссии – на длине волны 617 нм.

Химиотерапевтическое воздействие in vivo.

Схема лечения препаратом цисплатин. Лечение животных начинали по достижении опухоли ~0,5 см в диаметре (6-7 день после генерации опухоли). Трое животных получали цисплатин (5 мг/кг в 200 мкл PBS, внутривенно) три раза в неделю, всего 11 инъекций за 4 недели. Трём контрольным животным вводили 200 мкл PBS внутривенно в те же дни.

Схема лечения препаратом таксол. Лечение препаратом таксол начинали на 3-ий день после инокуляции опухолевых клеток. Четверем животным вводили таксол в дозе 10 мг/кг в 200 мкл PBS внутривенно 3 раза в неделю (всего 7-8 доз препарата), контрольным 4-м животным вводили 200 мкл PBS внутривенно в те же дни.

Опухоль измеряли с помощью штангенциркуля три раза в неделю и рассчитывали объем опухоли по формуле: $V = a \times b \times b/2$, где a – длина опухоли, b – ширина опухоли.

Статистическую обработку результатов. Для каждой временной точки в эксперименте анализировали 5-10 полей зрения. Обсчет проводился по 30-70 клеткам. Полученные данные рассчитывали как среднее значение (Mean) со стандартным отклонением (SD) или ошибкой среднего (SEM). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Колмагорова-Смирнова и критерия Шапиро-Уилка. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica10 (StatSoft, США). Были выполнены t-критерий Стьюдента и дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Бонферрони, различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для определения корреляции между pHс и пролиферацией использовали критерий Пирсона (r). Согласно шкале Чеддока при значении коэффициента корреляции 0-0,5 сила связи слабая, 0,5-0,7 – средняя, 0,7-1,0 – сильная.

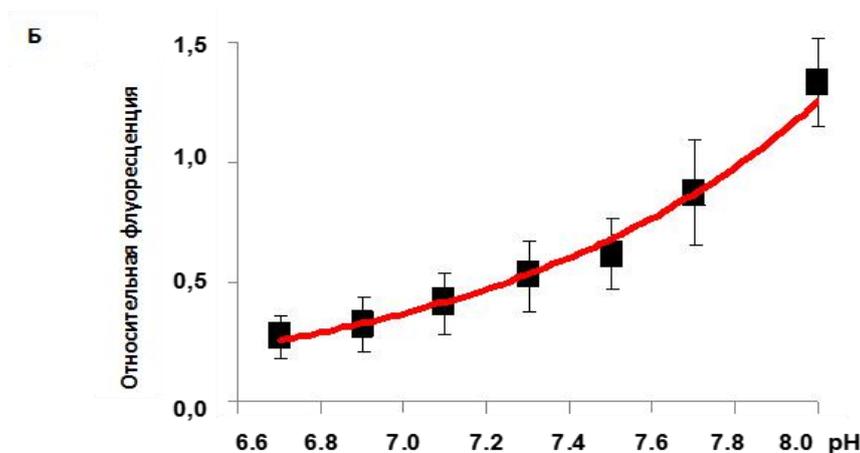
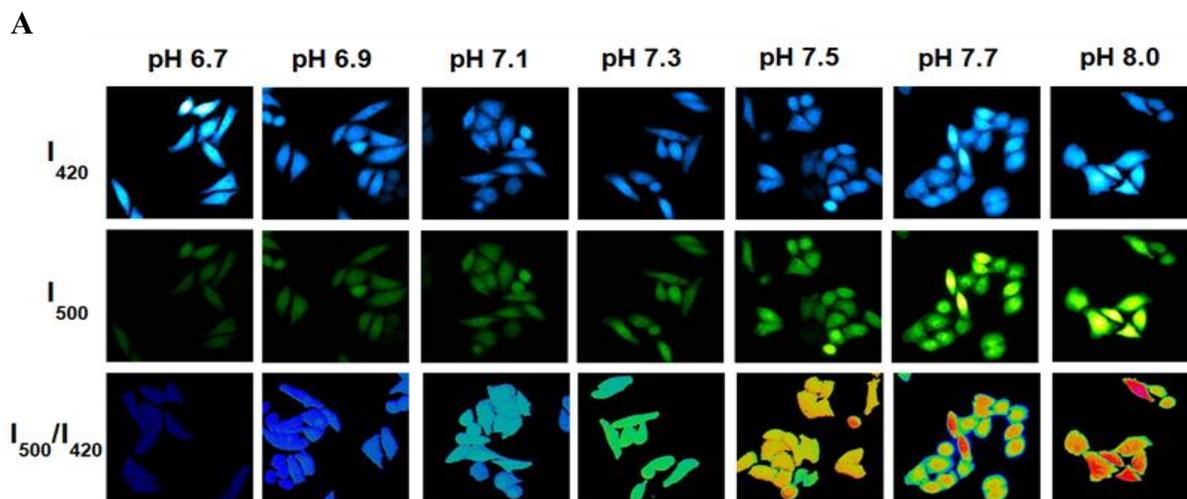


Рис. 3. Калибровка pH-чувствительного сенсора SypHer2. (А) флуоресцентный сигнал при возбуждении светом с длиной волны 405 (I_{405}) и 488 (I_{488}) и отношение интенсивностей флуоресценции (I_{488}/I_{405}) при повышении pH в диапазоне от 6,9 до 8,0; (Б) калибровочная кривая

Глава 3 содержит изложение и обсуждение результатов исследования.

1. Исследование pH цитозоля опухолевых клеток *in vitro* с помощью генетически кодируемого сенсора SypHer2

1.1. Двумерная клеточная культура

Известно, pH цитозоля (pH_c) опухолевых клеток является более щелочным (7.12-7.65 при норме 6.99-7.2) (Damaghi *et al.*, 2013). С помощью генетически-кодированного сенсора SypHer2 и описанных выше методов было установлено, что pH цитозоля клеток Hela Kyoto составил $7,35 \pm 0,1$, что хорошо согласуется с литературными данными.

1.2 Трехмерная клеточная культура

В качестве трехмерных клеточных культур были использованы сфероиды, сформированные из клеток Hela Kyoto. Сфероиды культивировали в течение 12 дней.

Флуоресценцию сенсора регистрировали на 5, 7 и 12-й день культивирования с помощью лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss LSM 710 (Carl Zeiss, Германия). Для возбуждения флуоресценции на длине волны 405 нм использовали диодный лазер, для возбуждения флуоресценции на длине волны 488 нм – аргонный лазер, регистрировали флуоресценцию в диапазоне от 435 нм до 550 нм, изображения получали при увеличении в 200 раз. Было установлено, что сфероид не однороден по

распределению сигнала сенсора, в нем визуализируются зоны с разным значением интенсивности сигнала, а, соответственно, и с разным значением pH. В центре сфероиды интенсивность сигнала ниже, следовательно, там локализуются клетки с более кислым значением внутриклеточного pH, а по периферии расположены клетки с более высокой интенсивностью сигнала, а, следовательно, с более щелочным значением pH (рис. 4).

Полученные нами данные о особенностях pH в опухолевых сфероиды соответствуют ранее известным литературным данным (Evans et.al., 2011). Установленный более кислый уровень pH в центральной части сфероидов может быть обусловлен недостатком кислорода и питательных веществ, что приводит к изменению клеточного метаболизма и, соответственно, закислению внутриклеточной среды.

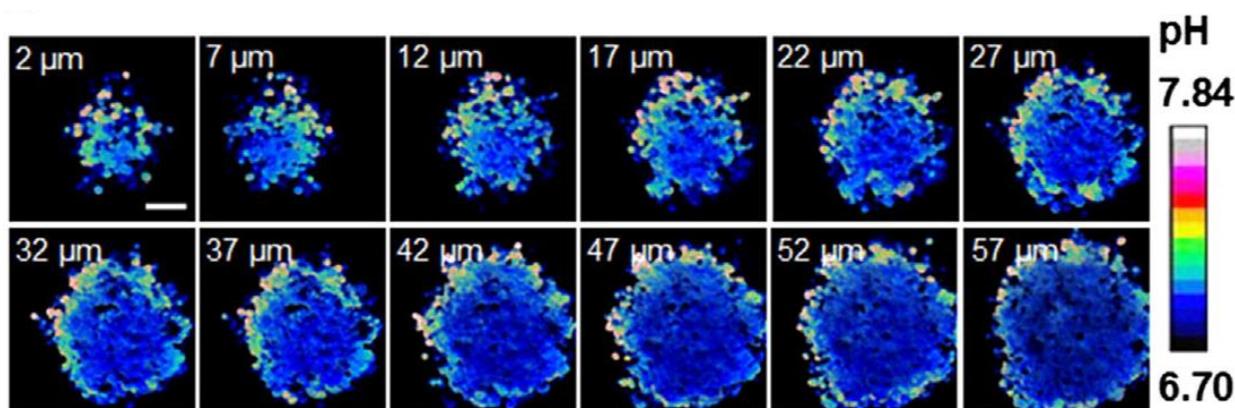


Рис.4 Исследование pH цитозоля опухолевых клеток в опухолевом сфероиде. Представлены изображения опухолевого сфероиды в поперечном сечении до глубины 57 мкм. Центральная область с низким сигналом сенсора соответствует клеткам с более кислым значение pH, а периферическая зона – клеткам с более щелочным значением pH. Микроскоп LSM-710, увеличение x200, возбуждение – 405 и 488 нм, регистрация - 435 нм до 550 нм.

2. Исследование динамики pH цитозоля опухолевых и стромальных клеток (фибробластов) при их взаимодействии *in vitro* с помощью генетически кодируемого сенсора SypHer2

Были проанализированы изменения pH цитозоля опухолевых клеток при взаимодействии со стромальными клетками (нормальные фибробласты человека). Для этого клетки, экспрессирующие pH-сенсор SypHer2, помещали на чашки для флуоресценции в виде монотипной культуры опухолевых клеток, а также в виде гетеротипной культуры (опухолевые клетки + фибробласты в соотношении 1:4). Регистрацию флуоресценции осуществляли на 1-ый, 2-ой, 3-ий и 5-ый день культивирования.

Было установлено, что в процессе сокультивирования внутриклеточный водородный показатель опухолевых клеток был достоверно ниже, чем в опухолевых клетках в условиях монокультуры (Рис.5).

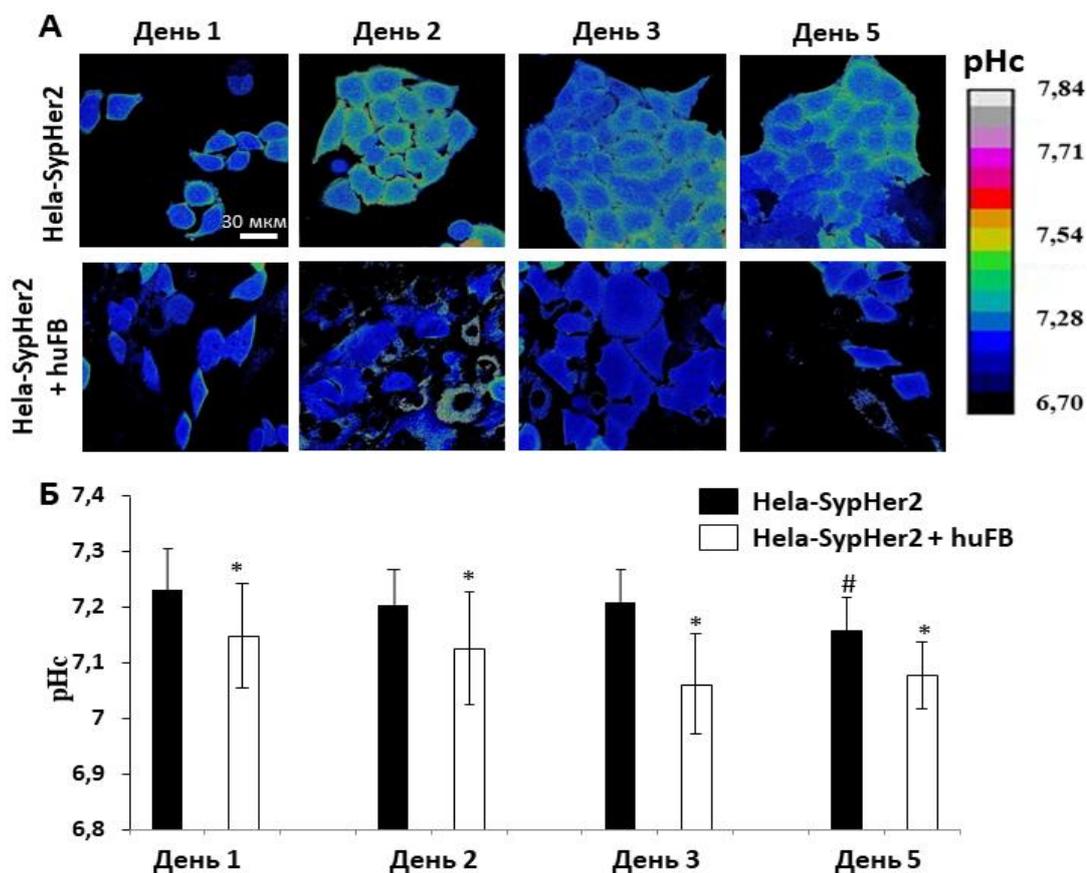


Рис.5. Анализ рН цитозоля опухолевых клеток в условиях сокультивирования с фибробластами. А – Результирующие флуоресцентные изображения опухолевых клеток в условиях моно- и сокультивирования, Б – Изменение рН опухолевых клеток в условиях сокультивирования с фибробластами, * - статистически значимое отличие отношения интенсивностей флуоресценции в сокультуре от таковой в монокультуре.

Также были проведены исследования уровня рН цитозоля фибробластов при совместном культивировании с опухолевыми клетками по аналогичной схеме. Было показано, что значения рНс постепенно снижаются с 7.47 ± 0.09 на 1-й день до 7.14 ± 0.10 на 5-й день в монокультуре и с 7.58 ± 0.09 до 7.23 ± 0.15 – в сокультуре. В монокультуре фибробластов динамика изменения рНс была такая же, как и в сокультуре. При этом уровень рНс фибробластов в условиях сокультуры был сдвинут в щелочную сторону по сравнению с монокультурой фибробластов на протяжении всего периода наблюдения (рис.6). Выявленное снижение рНс фибробластов в процессе культивирования может быть связано с накоплением продуктов обмена в процессе роста и размножения клеток, а также общим снижением активности клеток, вызванным контактным ингибированием.

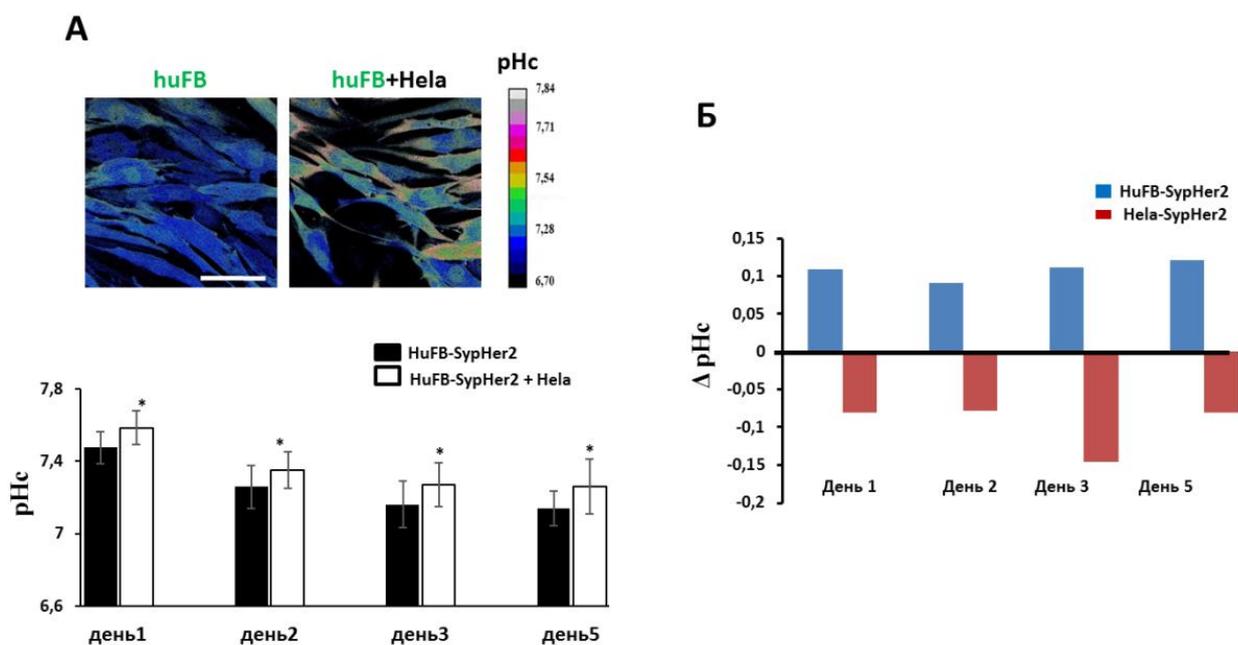


Рис. 7. Изменения рН цитозоля фибробластов в условиях сокультивирования с опухолевыми клетками. А – Репрезентативные микроскопические изображения фибробластов и сокультуры фибробластов с опухолевыми клетками на 5-й день культивирования. Масштабная линейка 50 мкм. Количественная оценка рНс. $M \pm SD$, $n=30-40$ клеток. *, $p \leq 0.05$ в сравнении с монокультурой. Б - изменения рН цитозоля опухолевых и стромальных клеток при их сокультивировании.

3. Изучение рН цитозоля опухолевых клеток *in vivo* с помощью генетически кодируемого сенсора SypHer2

Для изучения внутриклеточного водородного показателя опухолевых клеток *in vivo* были получены опухоли из клеток Hela Kyoto, экспрессирующих генетически кодируемый сенсор на рН SypHer2 согласно описанным выше методикам. Регистрацию сигнала сенсора проводили с помощью установки для молекулярного флуоресцентного имиджинга IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences, США) по описанной методике в динамике согласно схеме эксперимента.

Поскольку предварительные исследования показали, что уровень сигнала сенсора, детектируемый через кожу значительно ниже, чем сигнал непосредственно с поверхности опухоли, для регистрации флуоресценции животных наркотизировали и хирургическим путем снимали кожный лоскут с опухоли.

На рисунке 8 представлен пример флуоресцентных изображений, полученных с помощью установки IVIS Spectrum при возбуждении светом с длиной волны 430 и 500 нм, а также результирующее изображение опухоли на 18 день культивирования. Также представлены примеры результирующих флуоресцентных изображений опухоли в динамике в дни роста 7, 10, 14 и 18.

Расчет отношения I_{500}/I_{430} выявил высоко гетерогенный сигнал сенсора SypHer2 в пределах одной опухоли, что говорит о наличии зон с разными уровнями рНс в пределах опухоли. Каждая опухоль имела свой рисунок распределения сигнала. Полученные нами данные согласуются с представлением об опухоли как о фенотипически и функционально

гетерогенной системе, при этом каждая опухоль отличается от другой и в пределах отдельной опухоли также наблюдается неоднородность (Meacham, 2013).

Количественный анализ отношений I500/I430 по 10 опухолям (в каждой от 3 до 6 отдельных узлов) выявил статистически значимые отличия между центральной и периферической частями отдельных опухолевых узлов и зонами некроза.

По мере роста опухоли гетерогенность сигнала увеличивалась, однако значимых изменений пространственного распределения сигнала не происходило.

После получения криосрезов по описанной выше методике проводили регистрацию флуоресценции сенсора с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа DM IL LED (Leica, Германия) и соответствующих фильтров и последующую обработку изображений. Затем тот же срез окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином. При сопоставлении полученных изображений видно, что зоны типичной опухолевой ткани соответствуют зонам с низкой интенсивностью сигнала сенсора, т.е. содержат клетки с более кислым внутриклеточным рН, а зоны с высокой интенсивностью сигнала сенсора соответствуют зонам некроза. (Рис. 9).

4. Исследование динамики рН цитозоля опухолевых клеток с помощью генетически кодируемого сенсора SypHer2 при воздействии цисплатина *in vitro* и *in vivo*

Было проанализировано изменение рН цитозоля опухолевых клеток при добавления химиотерапевтического агента – цисплатин, относящего к классу цитотоксических препаратов. Предварительно была установлена ингибирующая концентрация для линии клеток Hela Kyoto, экспрессирующих рН-сенсор SypHer2.

Было установлено, что при добавлении препарата цисплатин в ингибирующей концентрации в первые 40 минут как в погибших, так и в выживших клетках наблюдается резкое снижение уровня внутриклеточного водородного показателя (~0,1 единиц рН). Затем у выживших клеток наблюдался период длительного и стабильного защелачивания ~на 0,27 единиц рН, который длился порядка 3-х часов. Погибшие клетки не были способны длительно поддерживать повышенный уровень внутриклеточного водородного показателя (Рис.10).

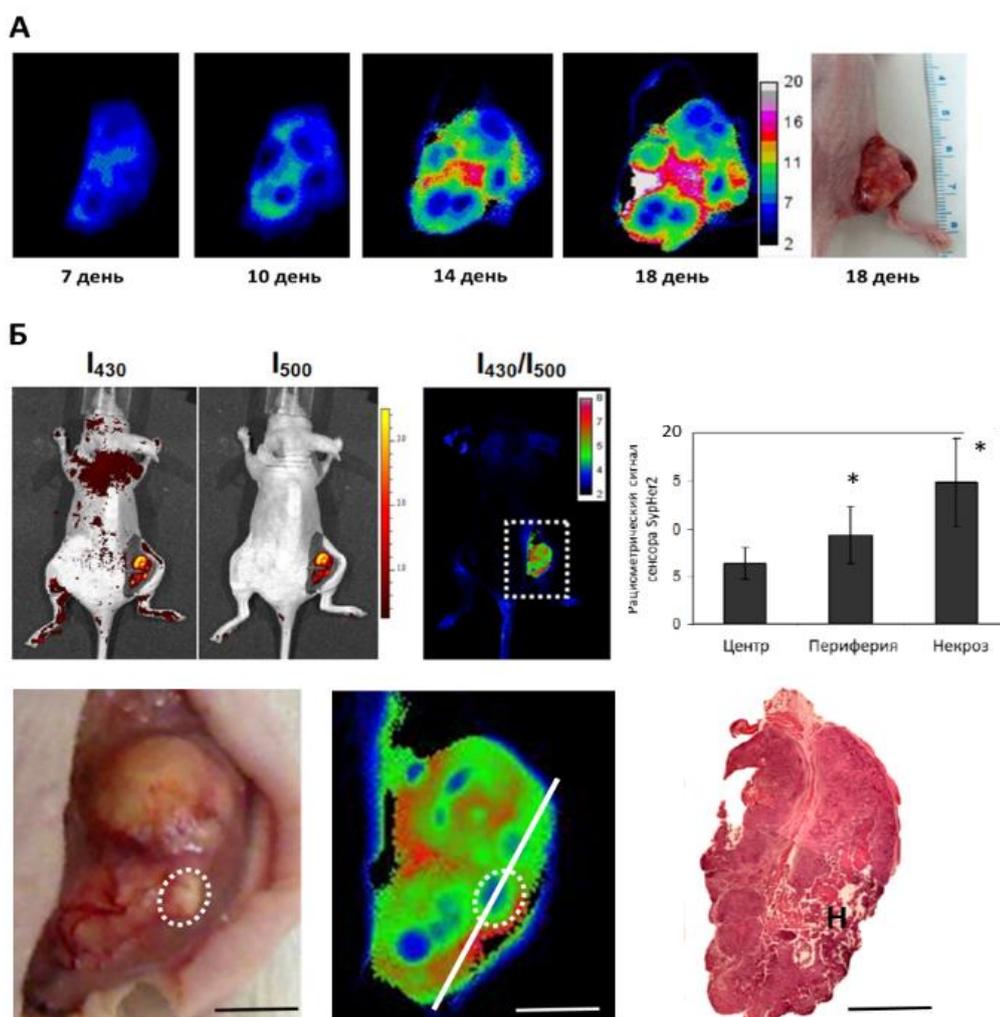


Рис.8. Распределение зон с различным значением рНс в опухоли in vivo. (А) распределение и изменение сигнала сенсора в процессе роста опухоли; (Б) верхний ряд: флуоресцентные изображения, полученные при возбуждении светом с длиной волны 430 и 500 нм (детекция на длине волны 540 нм) и результирующее изображение I_{500}/I_{430} ; количественный анализ отношения I_{500}/I_{430} в центре и на периферии отдельного опухолевого узла (n=42) и в зоне некроза (n=16). Нижний ряд: увеличенное результирующее флуоресцентное изображение, контурной линией обозначен отдельный опухолевый узел на флуоресцентном изображении и макрофотографии опухоли; сплошная белая линия – линия разреза пухоли; гистологический срез (окрашивание Г/Э), Н – некроз. Шкала 3 мм для всех изображений
* - статистически значимые различия значений, $p < 0,05$

Первое резкое закисление цитоплазмы согласуется с данными литературы (*Rebillard et al., 2007*) и может быть связано с ингибирование Na^+/H^+ обменника. В свою очередь, из литературы известно, что активное выведение препаратов из клетки сопровождается повышенным уровнем внутриклеточного рН (*Roepke et al., 1992, 1993*). В случае цисплатина, установлено, что данный препарат выводится в основном с помощью АТФаз, транспортирующих медь (АТР7А и АТР7В) (*Gupta et al., 2009*) и более активно транспорт идет, когда переносчики находятся в протонированной форме (*Safaei et al., 2008*). Следовательно, можно предположить, что длительный период защелачивания у выживших клеток является результатом активного выведения цисплатина из цитоплазмы.

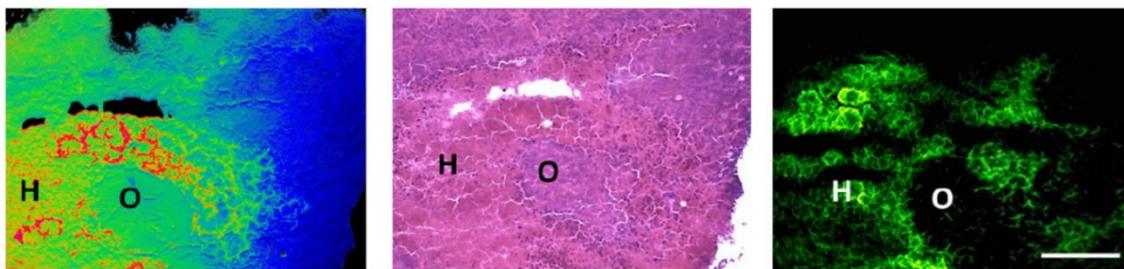


Рис.9. Соответствие между пространственным распределением ратиометрического сигнала сенсора на рН, морфологической структурой опухоли и данными о гипоксии: Слева направо: результирующее ратиометрическое изображение сигнала сенсора SypHer2 (F500/F430); окрашивание гематоксилином и эозином; иммуногистохимическое окрашивание антителами к пимонидазолу, конъюгированными флуоресцентной меткой FITC. Н –некроз, О - опухоль, размер шкалы -100 мкм.

На последнем этапе исследований было изучено изменение уровня внутриклеточного рН в опухолях Hela *in vivo* при лечении животных-опухоленосителей препаратом цисплатин.

На 35 день (спустя 3 дня после последнего введения цисплатина) животные подвергались эвтаназии, опухоли были забраны и разделены на две части: одна часть была направлена на гистологическое исследование, вторая – для исследования флуоресцентного сигнала сенсора SypHer2.

До забора опухолевого материала была проведена *in vivo* регистрация сигнала сенсора SypHer2 с помощью установки IVIS Spectrum. Было выявлено, что отношение сигналов I500/I430 выше в нелеченых опухолях по сравнению с лечеными ($2,43 \pm 0,38$ и $1,21 \pm 0,29$, соответственно, $p = 0.00001$) (рис. 11). Хотя определение рНс в абсолютных единицах для экспериментов *in vivo* в данном исследовании невозможно, можно с уверенностью говорить о значительном закислении цитоплазмы опухолевых клеток в результате лечения цисплатином.

Также на свежих криосрезах опухолей, экспрессирующих сенсор SypHer2, было выявлено соответствие областей со сниженным значением рНс опухолевой ткани, состоящей из живых, но дистрофически измененных опухолевых клеток. Эти наблюдения соотносятся с данными, полученными *in vitro* (рис. 9), согласно которым в живых неделящихся опухолевых клетках после длительного воздействия цисплатина наблюдается значительное закисление цитоплазмы.

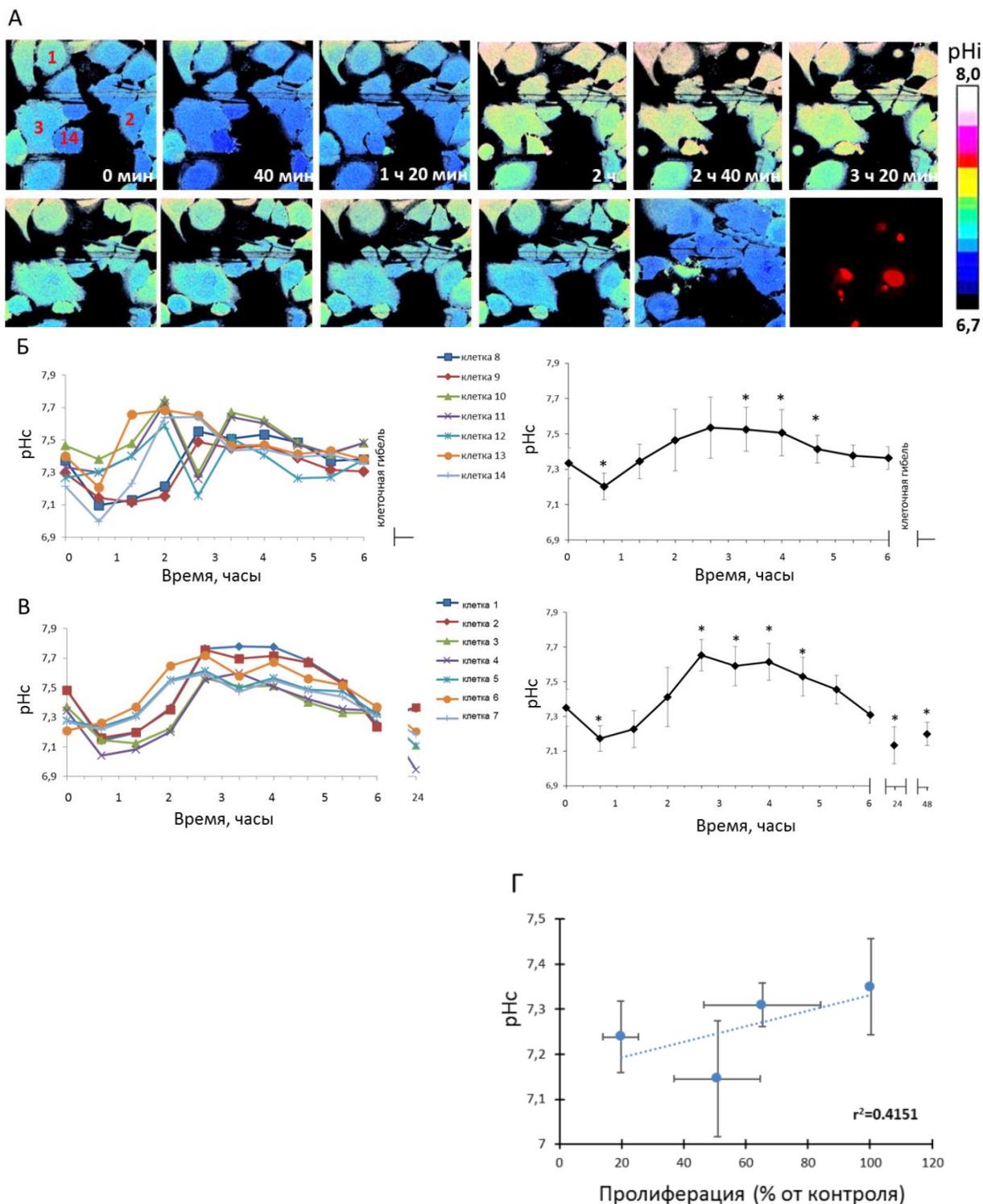


Рис.10. Динамика рНс в опухолевых клетках HeLa-SyrHer2 при воздействии цисплатина.

А – репрезентативные рациометрические изображения и окрашивание пропидиумом йодида спустя 24 часа (время после добавления цисплатина указано на каждом изображении, бар = 50 мкм). Б – ранние изменения рНс в клетках, которые в последствии погибли (в отдельных клетках и среднее значение, n=11). В - ранние изменения рНс в клетках со сниженной пролиферативной активностью (в отдельных клетках и среднее значение, n=75). Г – критерий корреляции Пирсона между рНс и пролиферативной активностью (пролиферация представлена в % от контроля). * - статистически значимое отличие от исходного рНс, $p \leq 0,05$

5. Исследование динамики рН цитозоля опухолевых клеток с помощью генетически кодируемого сенсора SypHer2 при воздействии таксола *in vitro* и *in vivo*

Было проанализировано изменение рН цитозоля опухолевых клеток при добавления химиотерапевтического агента – таксол, относящего к классу цитостатических препаратов. Предварительно была подобрана ингибирующая концентрация для линии клеток Hela Kyoto, экспрессирующих рН-сенсор SypHer2.

Было установлено, что при добавлении препарата таксол в ингибирующей концентрации в первые 40 минут как в погибающих, так и в выживающих клетках наблюдается резкое повышение уровня внутриклеточного водородного показателя (~0,2 единиц рН). Затем в выживающих клетках наблюдалось постепенное снижение внутриклеточного рН. При анализе динамики рН в отдельных клетках было показано, что в погибающих клетках имеется первый пик защелачивания

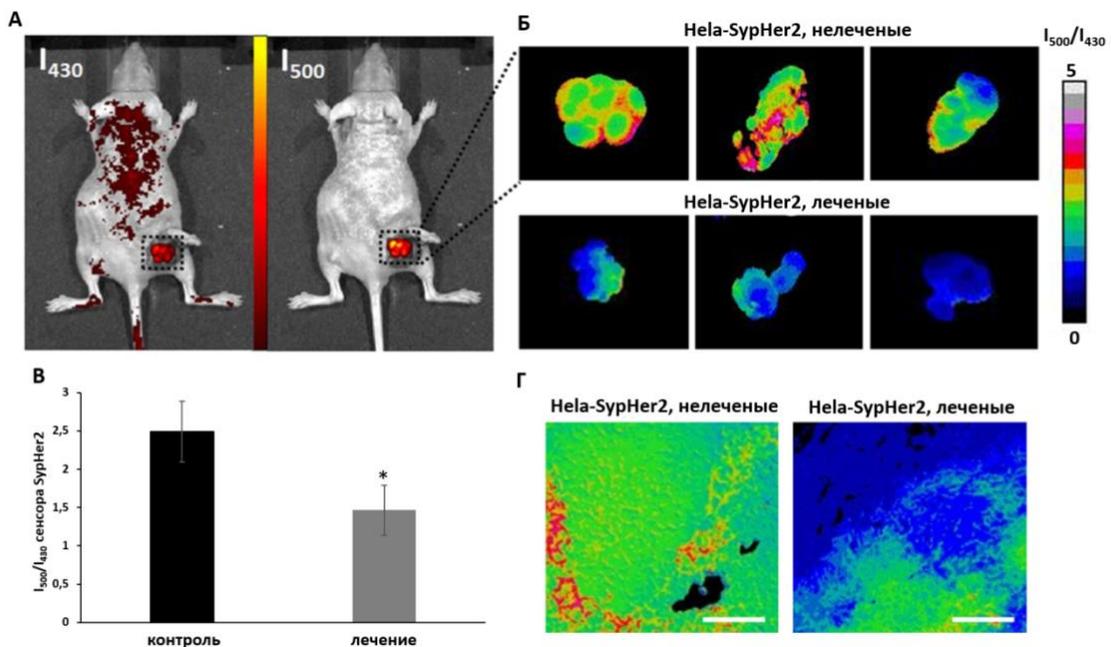


Рис. 11. Распределение зон с различным значением рНс в опухоли *in vivo* и *ex vivo* в результате лечения цисплатином. (А) флуоресцентные изображения, полученные при возбуждении светом с длиной волны 430 и 500 нм (детекция на длине волны 540 нм); (Б) результирующее изображение SypHer2 I₅₀₀/I₄₃₀ трех нелеченых (верхний ряд) и леченых (нижний ряд) опухолей (В) количественный анализ *in vivo*, $chtlytt \pm SD$, $n = 3$ tumors; (Г) результирующее изображение SypHer2 I₅₀₀/I₄₃₀ свежих криосрезов. Масштабная линейка 100 μ m. Изображения были получены на 35 день опухолевого роста (спустя три дня после последнего введения цисплатина)
*Статистически значимое отличие от контрольной группы, $p \leq 0.05$.

через 40 минут после добавления препарата, а затем рНс постепенно и плавно снижается, при этом ранняя гибель клеток наблюдается на фоне повышенного уровня рНс

относительно исходного ($7,47 \pm 0,11$ vs $7,29 \pm 0,10$, $p=0,028923$) в выживающих же клетках нами было зарегистрировано как минимум еще 3 периода повышения внутриклеточного рНс и довольно быстрое его снижение (Рис.12). Можно предположить, что системы регуляции рНс в более жизнеспособных клетках являются более лабильными и способны к быстрым перестроениям и наблюдается большая адаптация к кислым значениям рНс. Гибель же клеток на фоне повышенного рНс коррелирует с данными о Ca^{2+} -зависимом апоптозе, наблюдающемся в опухолевых клетках при воздействии таксола (*Pan et al., 2014*). В других независимых исследованиях на клетках Hela было показано, что выход ионов Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума происходит при повышении рНс (*Li et al., 2012, Danthuluri et al., 1990*). Основываясь на этих данных, мы можем предположить, что наблюдаемая в наших исследованиях гибель клеток может наступать в результате защелачивания цитоплазмы, вызванного таксолом.

Резкое защелачивание цитоплазмы опухолевых клеток при добавлении таксола может быть связано с работой переносчиков органических анионов (OATPs), участвующих в транспорте препарата (*VanWert et al., 2010, Svoboda et al., 2011*). В исследовании *Martinez-Becerra* и соавторов было высказано предположение, что транспорт через OATP1B1/OATP1B3 сопровождается электрогенным поступлением анионов (или выбросом катионов) (*Martinez-Becerra et al., 2011*). А в исследованиях *Leuthold* и соавторов было показано, что транспорт через OATPs ведет к активации выведения бикарбоната и, как следствие, быстрому защелачиванию внутриклеточного пространства (*Leuthold et al., 2009*).

На последнем этапе исследований было изучено изменение уровня внутриклеточного рН в опухолях Hela *in vivo* при воздействии таксола. Анализ флуоресценции сенсора SypHer2 *in vivo* был проведен с помощью установок IVIS Spectrum для регистрации поверхностной флуоресценции и микроскопа LSM880 для получения изображений с клеточным разрешением. Анализ флуоресценции сенсора SypHer2 *in vivo* был проведен, как описано в разделе «Материалы и методы» с помощью установок IVIS Spectrum для регистрации поверхностной флуоресценции и микроскопа LSM880 для получения изображений с клеточным разрешением.

При анализе опухолей, экспрессирующих сенсор SypHer2, с помощью установки IVIS Spectrum было выявлено некоторое снижение величины отношения сигналов I500/I430 в леченых опухолях по сравнению с нелечеными ($1,39 \pm 0,15$ и $1,99 \pm 0,31$, соответственно, $p=0,08$) (рисунок 13). По данным, полученным с помощью LSM880, усредненное отношение сигналов I500/I430 было несколько ниже, чем в контроле, но статистически не значимо

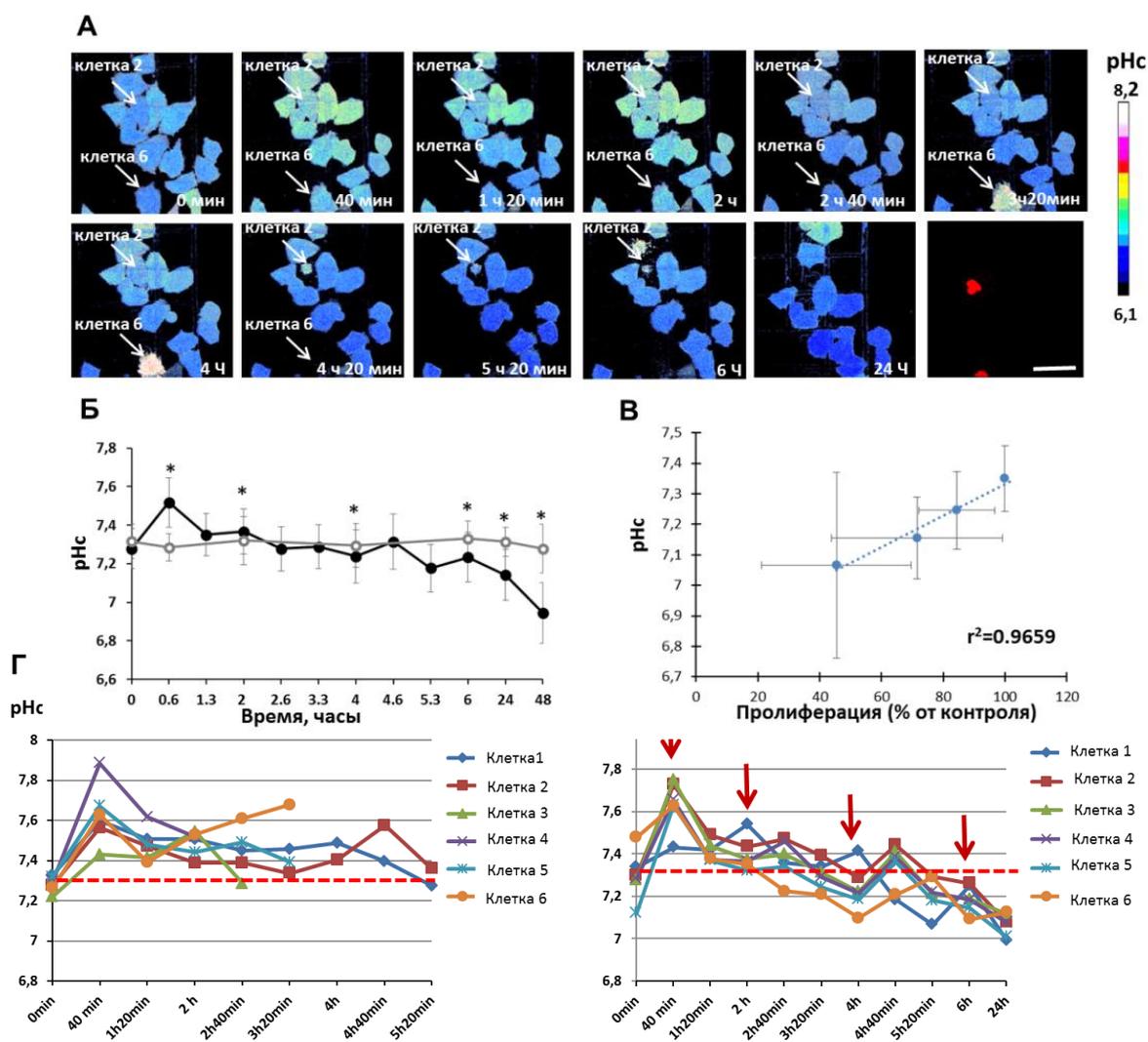


Рис. 12. Динамика рНс в опухолевых клетках Hela-SypHer2 при воздействии таксола. А – репрезентативные рациометрические изображения и окрашивание пропидиумом иодида спустя 24 часа (время после добавления таксола указано на каждом изображении, бар = 50 мкм). Б-динамика рНс, среднее по всем клеткам (n=50), В – критерий корреляции Пирсона между рНс и пролиферативной активностью (пролиферация представлена в % от контроля). Г – ранние изменения рНс в клетках, которые в последствие погибли Д- ранние изменения рНс в клетках, которые выжили, * - статистически значимое отличие от исходного рНс, $p \leq 0,05$

($0,43 \pm 0,10$ и $0,32 \pm 0,05$, соответственно, $p = 0,66$). Таким образом, в результате *in vivo* исследований явных изменений уровня внутриклеточного рН в опухолях в результате лечения таксолем не было выявлено. Однако можно отметить тенденцию к закислению внутриклеточного пространства опухолевых клеток в результате ответа на лечение таксолем, что согласуется с данными *in vitro*, когда в результате длительного воздействия (до 48 часов) таксола также наблюдалось закисление цитоплазмы. Таким образом, в результате *in vivo* исследований явных изменений уровня внутриклеточного рН в опухолях в результате лечения таксолем не было выявлено. Однако можно отметить тенденцию к закислению внутриклеточного пространства опухолевых клеток в результате ответа на лечение таксолем, что согласуется с данными *in vitro*, когда в результате

длительного воздействия (до 48 часов) таксола также наблюдалось закисление цитоплазмы.

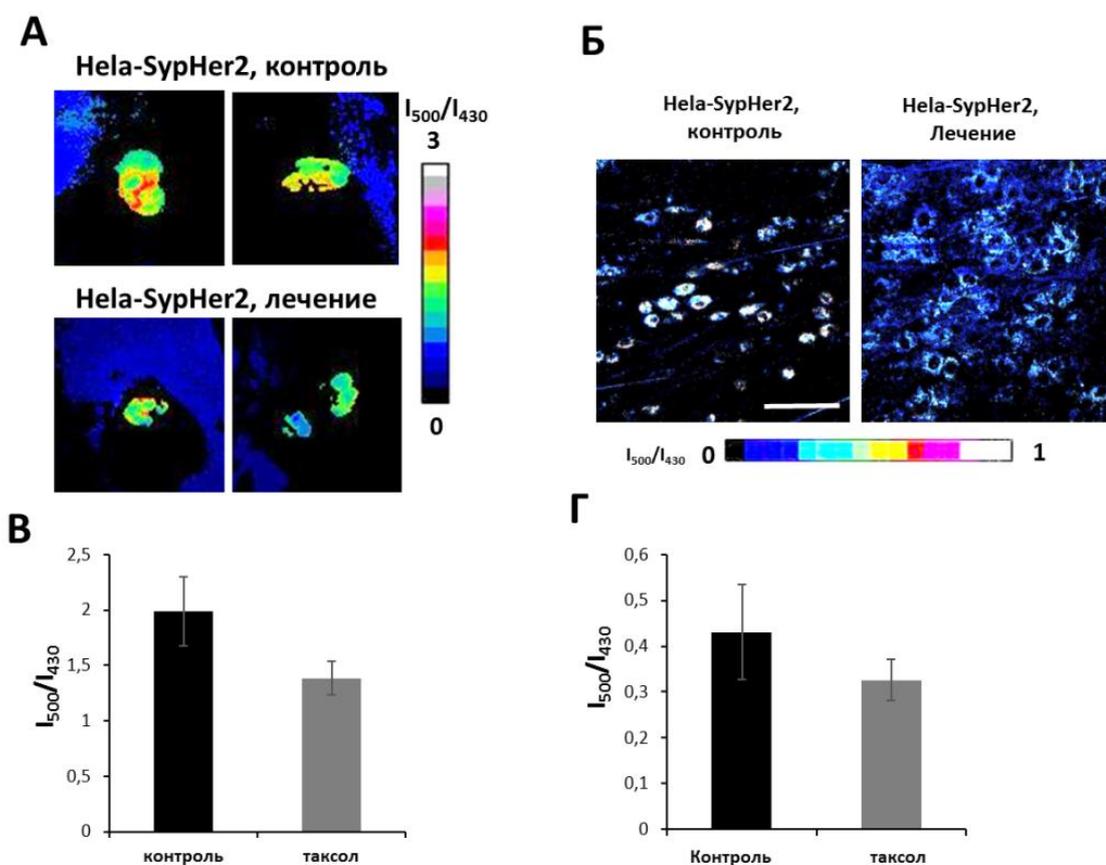


Рис. 13. Распределение зон с различным значением рНс в опухоли *in vivo* в результате лечения таксолом. (А) Результирующее изображение SypHer2 I_{500}/I_{430} леченых и нелеченых опухолей, поверхностный флуоресцентный имиджинг; (Б) Результирующее изображение SypHer2 I_{500}/I_{430} леченых и нелеченых опухолей, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, бар=50 мкм. (В) количественный анализ I_{500}/I_{430} *in vivo* для поверхностного флуоресцентного имиджинга, среднее \pm SD, n = 4 опухоли; (Г) количественный анализ I_{500}/I_{430} *in vivo* для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Изображения были получены на 17/19 день опухолевого роста

Выводы:

1. Разработаны методики регистрации внутриклеточного (цитоплазматического) рНс с использованием генетически кодируемого сенсора *SypHer2* и систем флуоресцентного имиджинга в опухолевых клетках на моделях с различной организацией: клеточный монослой, опухолевые сфероиды, подкожные опухоли мышей. Показано, что рНс клеток HeLa Kyoto в монослое *in vitro* составляет $7,35 \pm 0,10$. В опухолевых сфероидах зарегистрированы статистически значимые отличия рНс опухолевых клеток в центре узла и на периферии: $7,23 \pm 0,06$ и $7,43 \pm 0,06$, соответственно, $p=0,00000$. В опухолях животных оценка рНс возможна по соотношению интенсивностей флуоресценции сенсора.
2. При сокультивировании опухолевых клеток HeLa с фибробластами показаны разнонаправленные изменения рНс в опухолевых клетках и фибробластах. В опухолевых клетках в сокультуре на протяжении 5 дней рНс в среднем был ниже на 0,1 единицы, а в фибробластах выше на 0,1 единицы относительно соответствующей монокультуры.
3. При естественном росте опухоли HeLa у мышей *in vivo* показано постепенное повышение внутриклеточного уровня рН по мере роста опухоли и выявлено наличие зон с разными значениями рНс опухолевых клеток. *Ex vivo* подтверждено, что зоны с высоким уровнем рНс соответствуют зонам гипоксии.
4. При мониторинге рНс в клеточном монослое HeLa при воздействии цисплатина в выживающих клетках выявлен период защелачивания с $7,29 \pm 0,02$ до $7,6 \pm 0,07$ длительностью до 3 часов. В клетках с дистрофическими изменениями на фоне лечения рНс снижался до $7,19 \pm 0,07$ к 24 часам наблюдения. В сфероидах наблюдается стабильное защелачивание в центре до 24 часов наблюдения. *In vivo* в опухолях мышей при воздействии цисплатина сигнал сенсора (I500/I405) снижался с $2,43 \pm 0,38$ до $1,21 \pm 0,29$, $p=0,00001$, что указывает на закисление.
5. При мониторинге рНс в клеточном монослое HeLa при воздействии таксола в выживающих клетках выявлено постепенное закисление с $7,36 \pm 0,03$ до максимум $7,07 \pm 0,30$ ($p=0,00000$) к 48 часам наблюдения. Ранняя гибель клеток наблюдалась на фоне увеличения рНс до $7,47 \pm 0,11$ относительно исходного $7,29 \pm 0,10$, $p=0,028923$. Показана корреляция снижения пролиферации и снижения рНс при воздействии таксола ($R^2=0,9659$). В сфероидах наблюдается стабильное защелачивание как в центре, так и на периферии до 24 часов наблюдения. В экспериментах *in vivo* при лечении таксолом наблюдалась тенденция к снижению рНс в опухолях на фоне ингибирования опухолевого роста, что согласуется с данными *in vitro*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

1. **Дружкова И.Н.**, Лукина М.М., Дуденкова В.В., Игнатова Н.И., Ширманова М.В., Загайнова Е.В. Метаболические изменения в фибробластах при взаимодействии с опухолевыми клетками: НАД(Ф)Н, ФАД, цитоплазматический рН и пероксид водорода. Патогенез. 2019. Т. 17. № 4. С. 33-42. (ВАК, РИНЦ)
2. Shirmanova M., Sergeeva T., **Druzhkova I.**, Meleshina A., Lukina M., Dudenkova V., Shcheslavskiy V., Becker W., Belousov V., Mishina N., and Zagaynova E. Metabolic shifts in cell proliferation and differentiation in Multiphoton Microscopy and Fluorescence Lifetime Imaging Ed. by König, Karsten, 2018
3. Shirmanova MV, **Druzhkova IN**, Lukina MM, Dudenkova VV, Ignatova NI, Snopova LB, Shcheslavskiy VI, Belousov VV, Zagaynova EV. Chemotherapy with cisplatin: Insights into intracellular pH and metabolic landscape of cancer cells in vitro and in vivo. Sci Rep. 2017 Aug 21;7(1):8911. doi: 10.1038/s41598-017-09426-4 (WoS, ВАК, импакт-фактор – 4,122).
4. Zagaynova EV, **Druzhkova IN**, Mishina NM, Ignatova NI, Dudenkova VV, Shirmanova MV. Imaging of Intracellular pH in Tumor Spheroids Using Genetically Encoded Sensor SypHer2. Adv Exp Med Biol. 2017;1035:105-119. doi: 10.1007/978-3-319-67358-5_7 (WoS, ВАК, импакт-фактор – 1,98).
5. **Druzhkova IN**, Shirmanova MV, Lukina MM, Dudenkova VV, Mishina NM, Zagaynova EV. The metabolic interaction of cancer cells and fibroblasts - coupling between NAD(P)H and FAD, intracellular pH and hydrogen peroxide. Cell Cycle. 2016. Vol.15 N 9. P:1257-66 (WoS, ВАК, импакт-фактор – 4.565).
6. Shirmanova MV, **Druzhkova IN**, Lukina MM, Matlashov ME, Belousov VV, Snopova LB, Prodanetz NN, Dudenkova VV, Lukyanov SA, Zagaynova EV. Intracellular pH imaging in cancer cells in vitro and tumors in vivo using the new genetically encoded sensor SypHer2. Biochimica et Biophysica Acta. 2015, p. 1905–1911 (WoS, ВАК, импакт-фактор – 4.381).
7. **Irina Druzhkova**, Maria Lukina, Marina Shirmanova, Varvara Dudenkova, Tatiyana Sergeeva, Vsevolod Belousov, Sergey Lukyanova, Elena Zagaynova, Registration of intracellular pH in cancer cells with genetically encoded ratiometric sensor. Proc. SPIE 9537, Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging IV. 2015, p. 953710. doi:10.1117/12.2184756. (WoS, ВАК)
8. **Дружкова И.Н.**, М.М. Кузнецова (М.М. Лукина), М.В. Ширманова, Л.Б. Снопина, Н.Н. Проданец, В.В. Белоусов, С.А. Лукьянов, Е.В. Загайнова. Регистрация рН опухолевых клеток с помощью генетически кодируемого сенсора. Российский биотерапевтический журнал, 2014, №1, с.81 (РИНЦ, ВАК)

Патент:

1. **Дружкова И.Н.**, М.В. Ширманова, М.М. Лукина, Е.В. Загайнова, С.А. Лукьянов, В.В. Белоусов, М.Е. Матлашов, Л.Б. Снопина. Способ регистрации внутриклеточного рН опухолевых клеток. Патент РФ № 2014142436, опубликован 21.10.2014

Тезисы конференций:

1. Druzhkova I.N., Kuznetsova M.M., Shirmanova M.V., Snopova L.B., Prodanetz N.N., Belousov V.V. and Zagaynova E.V. Measuring of pH in tumor xenografts using new genetically

- encoded sensor. Proceedings of IV international symposium "Topical problems of biophotonics", 2013
2. Лукина М.М., Дружкова И.Н., Ширманова М.В., Снопина Л.Б., Проданец Н.Н., Белоусов В.В., Лукьянов С.А., Загайнова Е.В. Исследование водородного показателя рН в опухолях лабораторных животных при помощи генетически-кодируемого сенсора. Материалы VI Троицкой конференции "Медицинская физика и инновации в медицине", 2014
 3. Дружкова И.Н., Лукина М.М., Проданец Н.Н., Матлашов М.Е., Белоусов В.В., Лукьянов С.А., Ширманова М.В., Загайнова Е.В. Регистрация внутриклеточного рН в экспериментальных опухолях с помощью нового генетически кодируемого сенсора и методов флуоресцентной визуализации. Материалы съезда «VII съезд российского фотобиологического общества пос. Шепси, 14-20 сентября 2014 г.», Пущино, 2014, с. 113.
 4. Druzhkova I.N., Shirmanova M.V., Lukina M.M., Dudenkova V.V., Sergeeva T.F., Belousov V.V., Lukyanov S.A. and Zagaynova E.V. Investigation of pH and hydrogen peroxide in living cancer cells with genetically encoded sensors. Proceedings of V international symposium "Topical problems of biophotonics", 2015.
 5. Druzhkova I.N., Shirmanova M.V., Lukina M.M., Matlashov M.E., Dudenkova V.V., Belousov V.V., Lukyanov S.A. and Zagaynova E.V. The metabolic adaptations during cancer-stroma co-evolution: the intracellular pH, NAD(P)H changes and hydrogen peroxide production in cancer cells. Proceedings of AACR Special Conference on The function of tumor microenvironment in cancer progression, Jan. 7-10, 2016, p.61.
 6. Чичагова А.А., Дружкова И.Н., Дуденкова В.В., Игнатова Н.И., Лукина М.М., Ширманова М.В., Загайнова Е.В. Оценка раннего ответа опухолевых клеток на химиотерапевтическое воздействие по изменению уровня внутриклеточного рН. Материалы 20-ой Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века», 2016, 294-295.
 7. Zagaynova E.V., Shirmanova M.V., Druzhkova I.N., Lukina M.M., Snopova L.B., Prodanetz N.N., Belousov V.V., Lukyanov S.A. In vitro and in vivo investigation of pH tumor status using genetically encoded sensors and fluorescence imaging. SPIE. Photonics West 2015 BiOS (San Francisco, United States. 7-12 February 2015)
 8. Zagaynova E.V., Shirmanova M.V., Druzhkova I.N., Lukina M.M., Snopova L.B., Prodanetz N.N., Belousov V.V., Lukyanov S.A. Fluorescent imaging of tumor metabolic state. 3D International Conference on Biophotonics. (Italy, Florence, May 20-22 2015)
 9. Лукина М.М., Дружкова И.Н., Дуденкова В.В., Игнатова Н.И., Павлова Н.П., Ширманова М.В. Исследование метаболического ответа опухолевых клеток Hela Kyoto на химиотерапию цисплатином *in vitro* и *in vivo*. В книге: Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы докладов 70-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Институт биологии и биомедицины. 2017. С. 107.
 10. Шимолина Л.Е., Ширманова М.В., Лукина М.М., Дружкова И.Н., Игнатова Н.И., Загайнова Е.В. измерение внутриклеточного рН с использованием генетически-кодируемых сенсоров в системах *in vitro*. В книге: Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Нижний Новгород, 2020. С. 233.