

На правах рукописи

Шимолина Любовь Евгеньевна

**Исследование микровязкости цитоплазматической мембраны опухолевых клеток
при химиотерапии с помощью флуоресцентной
время-разрешённой микроскопии**

1.5.2 — биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2022

Работа выполнена на кафедре биофизики Института биологии и биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» и на базе научной лаборатории флюоресцентного биоимиджинга НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: **Ширманова Марина Вадимовна**
кандидат биологических наук
заместитель директора по науке, заведующий научной лабораторией флюоресцентного биоимиджинга НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант: **Загайнова Елена Вадимовна**
доктор медицинских наук
член-корреспондент Российской академии наук
ректор ФГАОУ ВО "Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского" (ННГУ)

Официальные оппоненты: **Васютинский Олег Святославович**
доктор физико-математических наук
главный научный сотрудник лаборатории газодинамических явлений Физико-технического института им. А.Ф. Иоффе РАН

Котова Елена Аврамовна
кандидат биологических наук
ведущий научный сотрудник отдела фотосинтеза и флуоресцентных методов исследований Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

Ведущая организация: ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 24.2.340.06 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603022, г. Нижний Новгород, проспект 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/2022/1266/diss-Shimolina-1266.pdf>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 года

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук



Акинчиц Елена Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Микровязкость (обратная величина текучести) мембран является одним из важнейших биофизических параметров клетки, поскольку ее изменение может быть связано с серьезными нарушениями морфологического или физиологического состояния. Клеточная мембрана образует барьер, необходимый для сохранения целостности и нормального функционирования клетки. Микровязкость мембран влияет на скорость диффузии, транспорт молекул, активность мембранных ферментов, синтетические процессы (Иваницкий, 1978; Swaminathan, 1997; Sutharsan, 2010). Кроме того, от микровязкости зависят эластические свойства мембраны, которые вовлечены во множество морфологических преобразований, включая деление, дифференцировку, миграцию. Изменение микровязкости мембран на клеточном уровне характерно для некоторых заболеваний, в том числе онкологических (Shinitzky et al., 1995).

Особый интерес представляет исследование микровязкости опухолевых клеток и тканей. Известно, что вязкость опухолевых клеток выше, чем нормальных, что может быть связано с разным липидным составом мембран (Guyer, 1942, 1947). Показано, что состав и количество жирных кислот, фосфолипидов и содержание холестерина различаются в нормальных и опухолевых клетках (Halpern, 1999). Также известно, что микровязкость опухолевых клеток изменяется в процессе терапии (фотодинамической и химиотерапии) и при развитии химиорезистентности (Rebillard et al., 2007; Kuimova et al., 2009; Cherhun, 2002; Huang, 2003). Несмотря на фундаментальное значение микровязкости мембран для клеточной биологии и физиологии, ее роль в патогенезе рака и реакции на терапию до конца не изучена.

На сегодняшний день среди методов измерения вязкости на микроскопическом уровне (микровязкости) наиболее перспективным является двухфотонная флуоресцентная микроскопия с временным разрешением FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) с применением флуоресцентных молекулярных роторов. Флуоресцентные молекулярные роторы — сенсоры вязкости, у которых интенсивность и время жизни флуоресценции зависят от вязкости микроокружения. При возбуждении молекулы происходит либо испускание фотона, либо внутримолекулярное вращение фрагментов молекулы. В вязких средах вращение затруднено, при этом интенсивность и время жизни флуоресценции увеличиваются. Благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам флуоресцентные молекулярные роторы являются привлекательными инструментами для решения задачи измерения микровязкости живых клеток. FLIM с молекулярными роторами дает возможность визуализировать микровязкость отдельных компартментов живой клетки с высоким пространственным разрешением и получать карту микровязкости клеток в реальном времени. Этот подход является достаточно новым, и биологические исследования с применением флуоресцентных молекулярных роторов на

сегодняшний день ограничены только несколькими работами *in vitro* (Wu Y. et al., 2013, Kuimova M. K. 2012, López-Duarte I. et al. 2014; Nipper M. E. et al., 2011; Hosny N. A. et al., 2013, Kuimova M. K. 2014), тогда как исследований *in vivo* не проводилось. Исходя из этого, оценка вязкостных свойств мембран опухолевых клеток на моделях *in vitro* и *in vivo* на основе FLIM как потенциального инструмента для изучения механизмов и оценки эффективности противоопухолевой терапии, является актуальной проблемой.

Цель работы состояла в изучении микровязкости цитоплазматической мембраны опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* в условиях естественного роста и под действием химиопрепаратов платинового ряда с помощью время-разрешённой микроскопии FLIM и флуоресцентного молекулярного ротора на основе BODIPY.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Адаптировать методики измерения микровязкости мембран опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* с использованием флуоресцентного молекулярного ротора на основе BODIPY и флуоресцентной время-разрешенной микроскопии FLIM.
2. Изучить изменения микровязкости мембран опухолевых клеток в монослойной культуре, сфероидах и опухолях мышей при естественном росте и действии препаратов платинового ряда.
3. Исследовать микровязкость мембран химиорезистентных опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*.
4. Сопоставить изменения микровязкости цитоплазматической мембраны опухолевых клеток при химиотерапии с ее липидным составом, оцененным с помощью время-пролетной масс-спектрометрии ToF-SIMS.

Научная новизна

1. Методом флуоресцентной время-разрешенной микроскопии с флуоресцентным молекулярным ротором впервые проведено измерение микровязкости опухолевых клеток в модельных 3D опухолевых сфероидах и опухолях мышей *in vivo*.
2. Впервые методом флуоресцентной микроскопии FLIM с временным разрешением с молекулярным ротором BODIPY 2 проведен анализ изменений вязкостных свойств мембран опухолевых клеток при воздействии химиотерапевтических препаратов платинового ряда *in vitro* и *in vivo*. Показано, что микровязкость мембран опухолевых клеток увеличивается в результате терапии цисплатином и оксалиплатином и не изменяется в резистентных клетках.
3. Впервые установлено, что увеличение микровязкости цитоплазматической мембраны опухолевых клеток при химиотерапии оксалиплатином связано с увеличением

количества холестерина и уменьшением количества поли- и мононенасыщенных жирных кислот.

Научно-практическая значимость

В работе продемонстрирована возможность прижизненного малоинвазивного исследования микровязкости мембран опухолевых клеток на разных моделях – монослойных клеточных культурах, 3D опухолевых сфероидов и опухолях животных с использованием молекулярного ротатора и метода FLIM. Показаны изменения микровязкости мембран опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* в ответ на терапию платина-содержащими препаратами. Получены новые знания о роли вязкости как биофизического параметра в реализации механизмов действия противоопухолевых препаратов и ответе опухолевых клеток на лечение. Проведенное исследование микровязкости мембран опухолевых клеток расширяет понимание механизмов ответа опухоли на лечение и действия химиопрепаратов, что важно для поиска новых противоопухолевых мишеней и способов мониторинга эффективности терапии. Полученные результаты могут стать базой для разработки методов модификации микровязкости мембран опухолевых клеток с целью повышения эффективности проводимой терапии. Полученные данные могут быть полезны при разработке новых видов противоопухолевого лечения и усовершенствования уже существующих.

Основные результаты работы могут быть использованы при разработке соответствующих разделов спецкурсов и лекций по биофизике, биомедицине, биохимии, фотобиологии, онкологии. Результаты работы могут иметь практическую ценность для задач опухолевой диагностики, мониторинга ответа опухоли на лечение, индивидуализации существующих протоколов лечения.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Адаптированные методики измерения микровязкости мембран с использованием флуоресцентного молекулярного ротатора BODIPY 2 и метода FLIM предоставляют возможность анализировать микровязкость мембран живых опухолевых клеток в моделях на разных уровнях организации: клеточном монослое, 3D опухолевых сфероидов и подкожных опухолях мышей.
2. При действии цисплатина и оксалиплатина регистрируется повышение микровязкости мембран опухолевых клеток в условиях *in vitro* и *in vivo*. Микровязкость мембран резистентных опухолевых клеток не меняется при действии терапевтических доз оксалиплатина.

3. Наблюдаемое при химиотерапии цисплатином и оксалиплатином увеличение микровязкости цитоплазматической мембраны опухолевых клеток обусловлено изменениями липидного состава мембраны.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, в получении и обработке изображений, в анализе, систематизации, интерпретации и обсуждении полученных результатов, а также совместно с соавторами участвовал в написании научных статей и апробации результатов исследования на конференциях.

Достоверность полученных результатов

Достоверность научных результатов и выводов, полученных в работе, обусловлена использованием широко применяемых на практике в биологии и медицине методов клеточных технологий и оптической визуализации биологических объектов. Данные, полученные новыми методами, подтверждены общепринятыми методами и соответствуют теоретическим выводам и обоснованиям. Полученный объем данных обеспечивает статистическую достоверность.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 35 научных работ, из них 6 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в перечень ВАК, и 29 тезисов конференций.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертации были представлены и обсуждены на Международных конференциях (11 докладов), Всероссийских конференциях (15 докладов) и Региональных конференциях (3 доклада), где 6 докладов были отмечены наградами за лучшее выступление. Результаты научной работы доложены на Международной Школе ADFLIM для молодых учёных, аспирантов и студентов (Москва 2016, Санкт Петербург 2017); Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021), где отмечены дипломом II степени; 20-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА» (Пушино, 2016); Всероссийской с международным участием Научной сессии молодых учёных и студентов VOLGAMEDSCIENCE (Нижний Новгород, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020), где дважды отмечены дипломом II степени; XXIV Международной молодёжной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2017); Нижегородской сессии молодых ученых (технические, естественные, математические науки) (Нижний Новгород, 2019, 2020, 2021), где дважды отмечены дипломами I и II степени; XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные

проблемы биомедицины - 2018 (Санкт Петербург, 2018), где отмечены дипломом I степени; 4th International Conference “Current Trends of Cancer Theranostics” (Trakai, Lithuania, 2018); VII International symposium “Topical problems of biophotonics» (Нижний Новгород, 2019); VI Съезде биофизиков России (Сочи, 2019); SPIE. Photonics West BiOS (San Francisco, United States, 2020, 2022), где отмечены наградой *JenLab Young Investigator Award 2020*; Saratov Fall Meeting 2020 (Саратов, 2020), European Molecular Imaging Meeting – EMIM (Thessaloniki, Greece, 2020), The annual International Conference on Advanced Laser Technologies – ALT (Москва, 2021); лауреат 3 степени VI открытого конкурса молодых ученых, работающих в области физики, химии, биофизики и технологии наноструктур и элементов наноэлектроники (г. Нижний Новгород, 2022).

Конкурсная поддержка

Проведенные исследования поддержаны проектами: РФФИ № 15-02-05189; РФФИ № 18-29-09054; РНФ № 20-14-00111. Получен грант РФФИ №19-32-90139 Аспиранты, для молодых учёных, обучающихся в аспирантуре, на выполнение фундаментальных научных исследований.

Структура и объем диссертации

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Диссертационная работа изложена на 117 страницах, содержит 42 рисунка. Список литературы содержит 137 источников, из них 131 зарубежный.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **главе 1** представлен обзор литературы, посвященный следующим основным темам: вязкость мембраны, структура и функции, факторы влияющие на микровязкость мембран, особенности вязкостных свойств опухолевых клеток, а также участие микровязкости мембраны в ответе на химиотерапию препаратами платинового ряда.

В **главе 2** перечислены использованные в работе объекты исследований, реактивы и оборудование, описаны методики исследований. Исследования одобрены Комитетом по Этике ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России.

Флуоресцентный молекулярный ротор BODIPY 2 (рис. 1), является производным 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацена (возб. 475 нм, рег. 510 нм). Ротор был синтезирован группой ученых под руководством Куимовой М.К. (Имперский колледж Лондона, Великобритания).

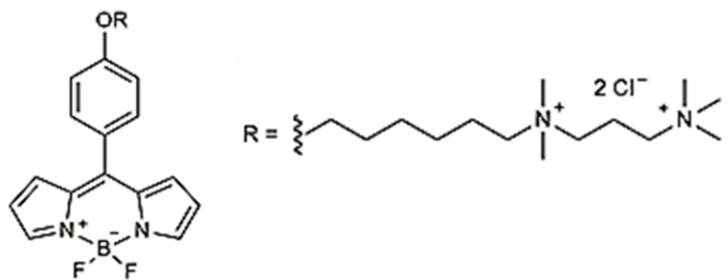


Рис.1. Структурная формула BODIPY 2

Культуры клеток. В работе использованы линии аденокарциномы шейки матки человека HeLa Kyoto, колоректального рака мышей CT26, колоректального рака человека HCT116 и HT29, химиорезистентная линия HCT116-OXAR (*Shimolina et al., 2021*). Клетки культивировали по стандартной методике в CO₂ инкубаторе при 37° С в атмосфере 5% CO₂, с использованием питательной среды ДМЕМ (Панеко, Россия) с добавлением глутамина, пенициллина и стрептомицина, а также 10% бычьей эмбриональной сывороткой (HyClone, США).

Опухолевые сфероиды. Работа проводилась на опухолевых клетках линии HeLa Kyoto в условиях 3D культивирования. Клетки высевались на круглодонные низкоадгезивные планшеты в количестве 100 клеток на лунку. На третий день после высевания в лунках планшета формировались сфероиды.

Животные. Эксперименты выполнены на самках мышей линии Balb/C и nu/nu, массой 20-22 г, общее количество животных - 25.

Модельные опухоли получали путем подкожной инъекции на правое бедро животным суспензии клеток в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) в количестве 500 тыс. опухолевых клеток CT26 для мышей линии Balb/C; 2,5 млн опухолевых клеток HCT116 и HCT116-OXAR для мышей линии nu/nu. Замер опухолей проводили 3 раза в неделю с помощью штангенциркуля.

Протоколы химиотерапии.

Цисплатин (Тева, Израиль) для клеток монослойной культуры CT26 был использован в концентрации - 2.6 μМ (IC₅₀), для HeLa Kyoto – 1.1 (IC₅₀/2), 2.3 (IC₅₀) и 4.3 (IC₅₀×2) μМ. Для экспериментов с опухолевыми сфероидами применяли концентрацию препарата 8.6 μМ.

Оксалиплатин (Тева, Израиль) был использован в концентрации 2.0 μМ (IC₅₀) для клеток HCT116 и HCT116-OXAR. Для *in vivo* экспериментов на мышах с опухолями HCT116 и HCT116-OXAR был использован оксалиплатин в дозе 7,5 мг/кг в 100 мкл PBS внутривенно три раза в неделю, начиная с 10-го дня роста опухоли.

Анализ жизнеспособности клеток in vitro в монослойных клеточных культурах и опухолевых сфероидах проводили с помощью окрашивания Пропидиумом иодидом (PI) и Кальцеином (Thermo Fisher Scientific, Великобритания). Визуализацию красителей осуществляли на флуоресцентном микроскопе Leica DMIL (Leica, Германия). Кальцеин окрашивает только живые клетки, для регистрации сигнала использовали светофильтр YFP ET

(возб: 500/20, рег: 535/30). Пропидиум иодид окрашивает мертвые клетки, флуоресценцию детектировали при помощи светофильтра TX2 green (возб: 560/40, рег: 645/75).

Фармакокинетический анализ концентрации роторов BODIPY 2 в плазме крови мышей Balb/C осуществлялся методом забора крови из ретроорбитального синуса с дальнейшим центрифугированием в течение 15 мин при 2500 об/мин для отделения плазмы. Количественное определение ротора проводили на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 (возб 475 нм, рег. 510 нм).

Флуоресцентный имиджинг мышей с опухолями CT26 *in vivo* проводили на установке для флуоресцентного молекулярного имиджинга IVIS-Spectrum (Caliper Life Sciences, США). Флуоресценцию ротора возбуждали на длине волны 500/30 нм и детектировали при 540/20, экспозиция 2 с. Интенсивность флуоресцентного сигнала ((P/S/см²/ср)/(мкВт/см²)) в опухоли оценивали с помощью программы LivingImage, выбирая опухоль в качестве области интереса (ROI).

Многофотонная флуоресцентная микроскопия и FLIM. В работе были использованы многофотонный томограф MPTflex (JenLab, Германия) и лазерный сканирующий микроскоп LSM 880 (Carl Zeiss, Германия). Оба прибора оснащены настраиваемым 80 МГц титан-сапфировым лазером (MaiTai) и FLIM-модулем SPC 150 TCSPC (Becker & Hickl, Германия). На многофотонном томографе флуоресценцию ротора BODIPY 2 возбуждали на длине волны 850 нм и детектировали в диапазоне 409-660 нм.. На лазерном сканирующем микроскопе флуоресценция BODIPY 2 возбуждалась на длине волны 850 нм и детектировалась в диапазоне 500-550 нм. Изображения FLIM были получены с помощью водно-иммерсионного объектива S-Apochromat 40×/1.2 NA W Corr при времени сбора фотонов 60 с. Средняя мощность на образце составляла ~ 7 мВт. Минимальное количество фотонов под кривой составляло ~3000 при биннинге 1. Все эксперименты проводились в затемненном помещении с изолированными от внешнего освещения детекторами.

Анализ времени жизни флуоресценции производился в программе SPCLmage (Becker & Hickl GmbH, Германия). Изображение импортировали в программу, выбирали участки мембраны с допустимым хи-квадратом (от 0.8 до 1.2) с моноэкспоненциальным затуханием флуоресценции. Полученные значения времён жизни флуоресценции (нс) были переведены в значения вязкости (сП) с использованием калибровочного графика.

Патоморфологический анализ опухолей. Для гистологического анализа образцы опухолей помещали в 10% раствор нейтрального формалина. Фиксированные образцы ткани обезвоживали, заливали парафином, готовили срезы толщиной 5–7 мкм по стандартной методике с окраской гематоксилином и эозином для детального морфологического анализа. Срезы тканей исследовали с помощью микроскопа Leica DM2500 (Leica, Япония).

Масс-спектрометрия ToF-SIMS. Для анализа клетки выращивали на покровном стекле, покрытом поли-L-лизинном в количестве 5×10^5 . Фиксировали 4% параформальдегидом (ПФА) в течение 60 мин. Время-пролетную масс-спектрометрию вторичных ионов проводили на приборе ToF-SIMS 5 (ION-TOF, Германия), оснащенном источником жидкометаллических ионов Bi^{3+} с энергией 30 кэВ. Были проанализированы сигналы фосфатидилхолина (m/z 224), сфингомиелина (m/z 264) и холестерина (m/z 385), а также насыщенных, моно- и полиненасыщенных жирных кислот.

Статистический анализ данных. Для каждого образца *in vitro* и *in vivo* были получены FLIM-изображения с 7-10 полей зрения, обсчет проводили по 30-80 клеткам. Полученные данные рассчитывали как среднее значение (Mean) со стандартным отклонением (SD) или ошибкой среднего (SEM). Сравнительный анализ данных проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA10 (StatSoft, США), использованы t-критерий Стьюдента и дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Бонферрони. При $p \leq 0.05$ различия считались статистически значимыми.

Методика измерения микровязкости мембран с помощью флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 и метода FLIM in vitro

Для адаптации методики визуализации микровязкости на клеточных культурах были использованы клетки СТ26. Показано, что ротор BODIPY 2 локализовался в цитоплазматической мембране и характеризовался высокой интенсивностью флуоресценции. Были протестированы следующие условия инкубации клеток с ротором BODIPY 2: 1) в растворе Хэнкса без Ca^{2+} , Mg^{2+} при 4°C в течение 5 мин, концентрация BODIPY 2 $8.9 \mu\text{M}$; 2) в растворе Хэнкса с Ca^{2+} , Mg^{2+} при 22°C в течение 5 мин, концентрация BODIPY 2 $8.9 \mu\text{M}$; 3) в растворе Хэнкса без Ca^{2+} , Mg^{2+} , при 4°C в течение 5 мин, концентрация BODIPY 2 $4.5 \mu\text{M}$. В результате были подобраны оптимальные условия инкубирования клеток с молекулярным ротором, которые позволяют визуализировать микровязкость цитоплазматических мембран в течение 20-30 мин. Культуральную среду заменяли на охлажденный раствор Хэнкса без Ca^{2+} , Mg^{2+} , инкубировали на холоде при 4°C в течение 3-5 мин, затем заменяли раствор Хэнкса на ледяной раствор молекулярного ротора ($4.5 \mu\text{M}$, 0.1% ДМСО). Анализ FLIM изображений показал, что затухание флуоресценции ротора в плазматической мембране имеет моноэкспоненциальный характер, что свидетельствует о его корректной работе. Был подобран порог визуализации флуоресценции (Threshold = 25) для отсечки автофлуоресценции клеток.

В качестве трехмерных клеточных культур были использованы опухолевые сфероиды, сформированные из клеток HeLa Kyoto. Нужное количество сфероидов (8-10) осторожно помещали в чашки со стеклянным дном FluoroDishes, которые затем помещали в CO_2 инкубатор на 2 ч для прикрепления сфероида. Для окраски ротором использовали протокол для монослойных культур, однако время инкубации с раствором Хэнкса было увеличено до 7 мин,

доза молекулярного ротора была увеличена до 8.9 μM . Это обусловлено более плотной структурой опухолевых сфероидов по сравнению с монослойной культурой. Методика представлена на рисунке 2.

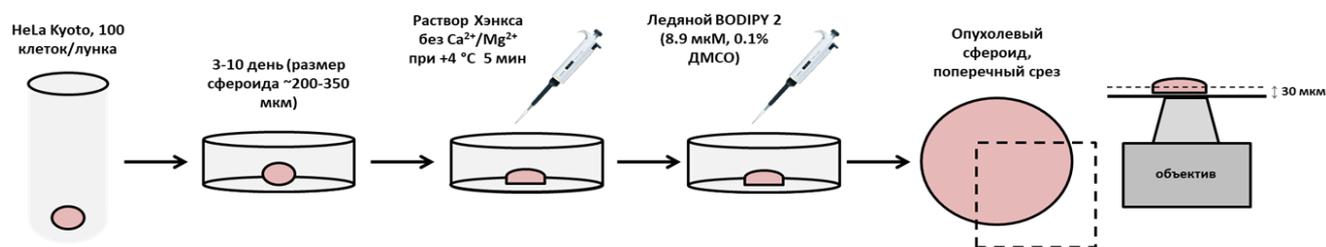


Рис.2. Методика вязкостного имиджинга клеток опухолевого сфероида

Методика измерения микровязкости клеток опухолей мышей *in vivo* при помощи флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 и метода FLIM

Для формирования опухолей мышам линии Balb/C подкожно вводили клетки СТ26, мышам линии nu/nu подкожно вводили клетки НСТ116. Исследование микровязкости проводили, когда размер опухолей составлял 7-10 мм. Молекулярный ротор вводили в хвостовую вену в концентрации 3мг/кг, получение изображений через 1ч. Непосредственно перед экспериментом животное наркотизировали и в стерильных условиях проводили препарирование кожного лоскута над опухолью. Тело мыши размещали таким образом, чтобы объектив микроскопа плотно прилегал к опухолевой ткани. По автофлуоресценции НАДН (возб. 750 нм, рег. 455–500 нм) фокусировались на клетках опухоли, выбирали область интереса, затем проводили регистрацию сигнала молекулярного ротора BODIPY 2 (возб. 850 нм, рег. 500-550 нм на LSM 880, рег. 409-660 нм на MPTflex). Имиджинг осуществлялся в течение 20-30 мин с получением FLIM-изображений с 7-10 полей зрения. После проведения эксперимента опухолевую ткань забирали для патоморфологического анализа. Методика представлена на рисунке 3.

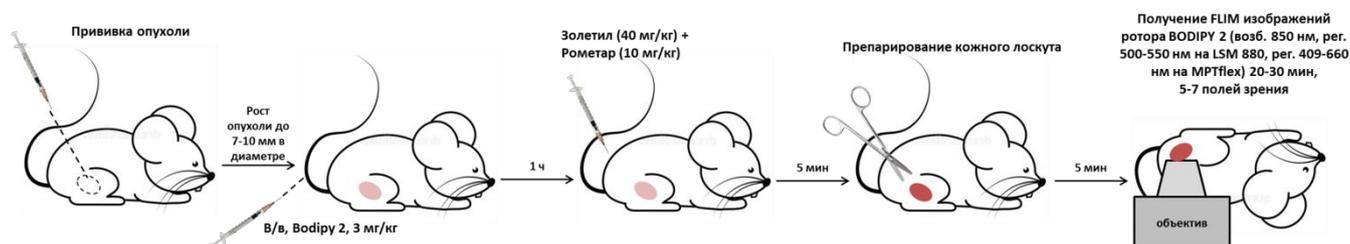


Рис.3. Методика *in vivo* вязкостного имиджинга опухолей животных

Глава 3 содержит изложение и обсуждение результатов исследования.

1. Оценка микровязкости мембран опухолевых клеток в процессе химиотерапии на монослойных культурах

С помощью молекулярного ротора BODIPY 2 и метода FLIM были получены значения микровязкости мембран для клеточных линий: НСТ116, НТ29, СТ26 и HeLa Kyoto (рис. 4).

Показано, что наибольшее время жизни флуоресценции ротора зарегистрировано в мембранах клеток НСТ116 - $3,19 \pm 0,14$ нс, что соответствует значению вязкости 492 ± 33 сП. В мембранах клеток НТ29 время жизни флуоресценции ротора составило 3.15 ± 0.13 нс, что соответствует вязкости 478 ± 38 сП. Мембраны клеток СТ26 были менее вязкими - время жизни флуоресценции $2,88 \pm 0,16$ нс, вязкость 362 ± 39 сП. Наиболее жидкими мембранами среди исследуемых линий обладали клетки HeLa Kyoto - время жизни флуоресценции $2,65 \pm 0,15$ нс, что соответствует значению вязкости 344 ± 36 сП.

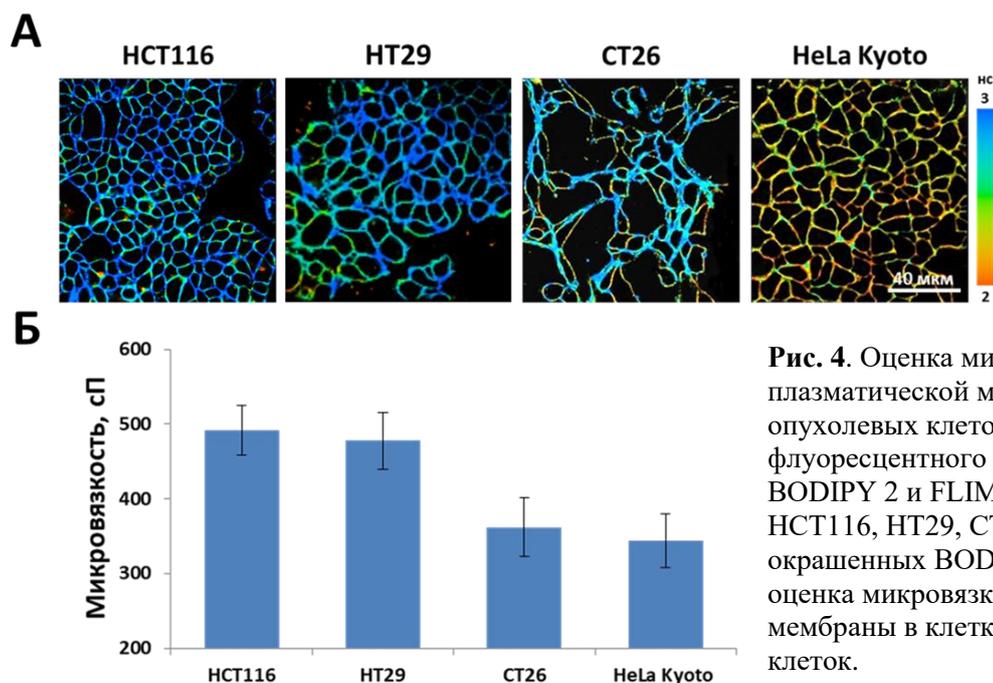


Рис. 4. Оценка микровязкости плазматической мембраны культивируемых опухолевых клеток с использованием флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 и FLIM. FLIM-изображения клеток НСТ116, НТ29, СТ26 и HeLa Kyoto, окрашенных BODIPY 2 (А) и количественная оценка микровязкости плазматической мембраны в клетках (Б). Среднее \pm SD, 30-50 клеток.

Были получены данные об изменении микровязкости плазматической мембраны в опухолевых клетках СТ26 и HeLa Kyoto при действии цисплатина. В контрольных клетках СТ26 измеренное время жизни ротора BODIPY 2 составило $\sim 2,55 \pm 0,07$ нс, что соответствовало значению вязкости 322 ± 21 сП. За период времени от 10 мин до 1 ч инкубации с $2,57$ мкМ цисплатина микровязкость мембраны снизилась по сравнению с контролем и составила от ~ 290 до 300 сП (различия с контролем статистически незначимы). При дальнейшей инкубации с цисплатином микровязкость увеличивалась и через 24 часа стала больше контрольного значения, 397 ± 17 сП ($p < 0,005$) (рис. 5).

Для оценки влияния дозы препарата на микровязкость мембран были протестированы три дозы цисплатина ($1,1$, $2,3$ и $4,5$ μM) на клетках HeLa Kyoto (рис. 5). Дозозависимого эффекта не обнаружено, наблюдаемые изменения микровязкости мембран характерны для всех использованных доз цисплатина. При лечении клеток HeLa цисплатином в ранние временные точки мониторинга (от 10 до 60 мин) микровязкость снижалась с 326 ± 22 сП до ~ 300 сП (различия с контролем статистически не значимы). Начиная с 6 ч, значение микровязкости мембраны увеличивалось. Через 24 часа микровязкость мембраны составляла 427 ± 26 сП. Через 48 ч после удаления цисплатина из среды высокие значения микровязкости сохранялись.

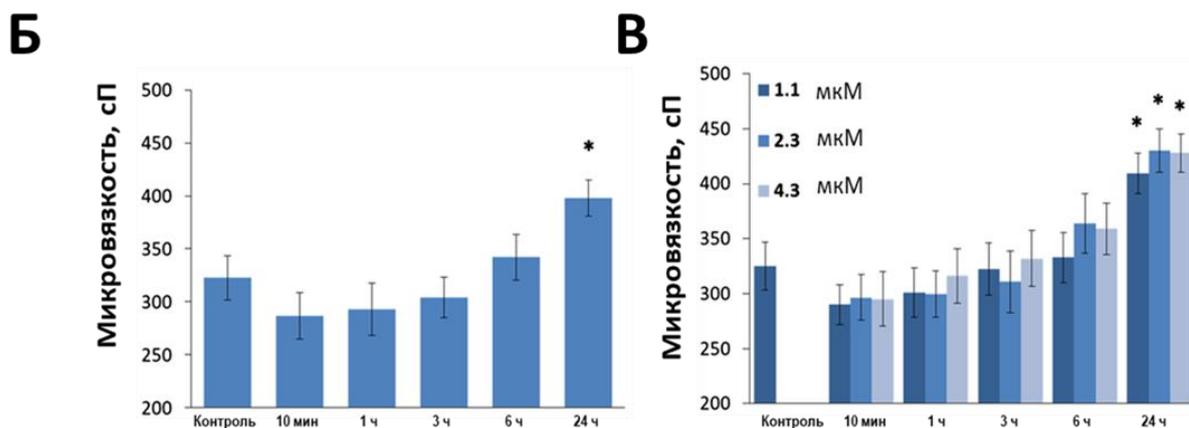
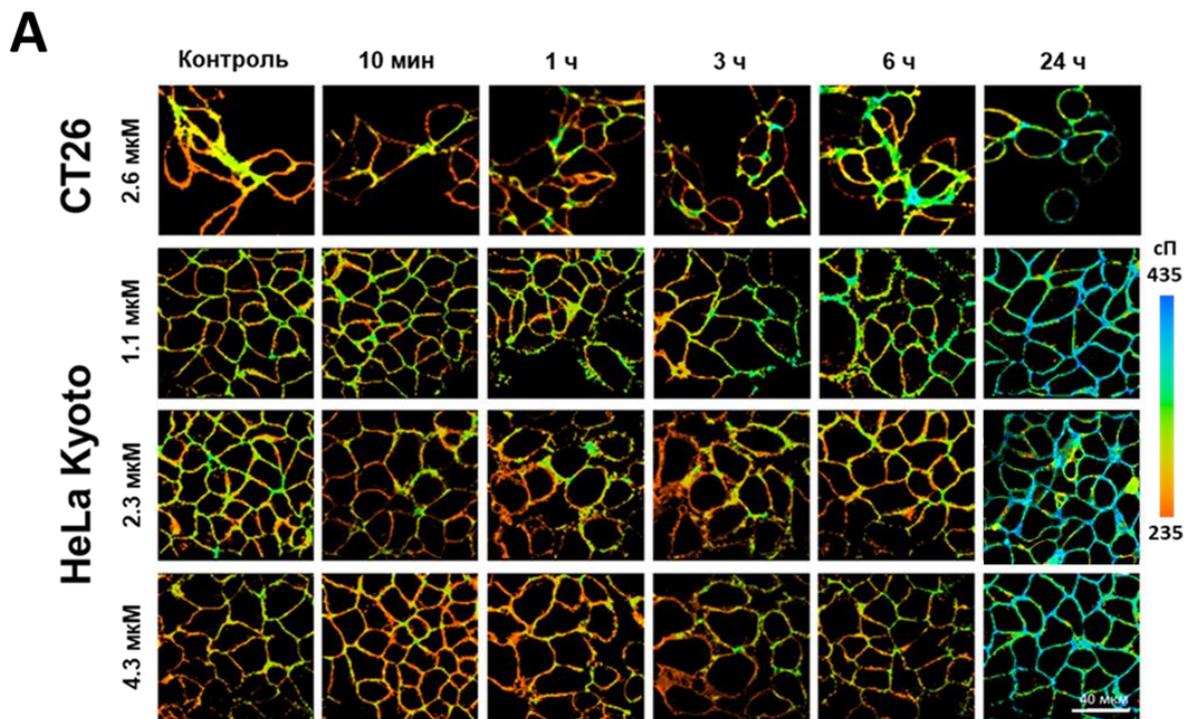


Рис. 5. Микровязкость плазматической мембраны в клетках СТ26 и HeLa Kyoto до (контроль) и в течение 24 ч воздействия цисплатина. FLIM изображения микровязкости мембран клеток (А), количественная оценка микровязкости мембран клеток СТ26 (Б) и клеток HeLa Kyoto (В) при химиотерапии. Среднее \pm SD, n = 40-50 клеток. *, $p \leq 0,005$ по сравнению с контролем.

Было зарегистрировано увеличение количества мёртвых клеток (PI-положительных) для всех исследуемых линий после 24 ч инкубации с цисплатином, что свидетельствует об эффективности проводимой терапии. Важно отметить, что микровязкость мембран измерялась только в жизнеспособных клетках, так как в мертвых клетках ротор накапливался внутри клеток, где его флуоресценция затухала биэкспоненциально, что свидетельствует об агрегации ротора.

Методом масс-спектрометрии зарегистрировано увеличение сигнала сфингомиелина и холестерина, и уменьшение сигнала моно- и полиненасыщенных жирных кислот в мембранах клеток после 24 ч инкубации с цисплатином (рис. 6). Выявленные изменения обуславливают увеличение микровязкости мембран после 24 ч инкубации с цисплатином.

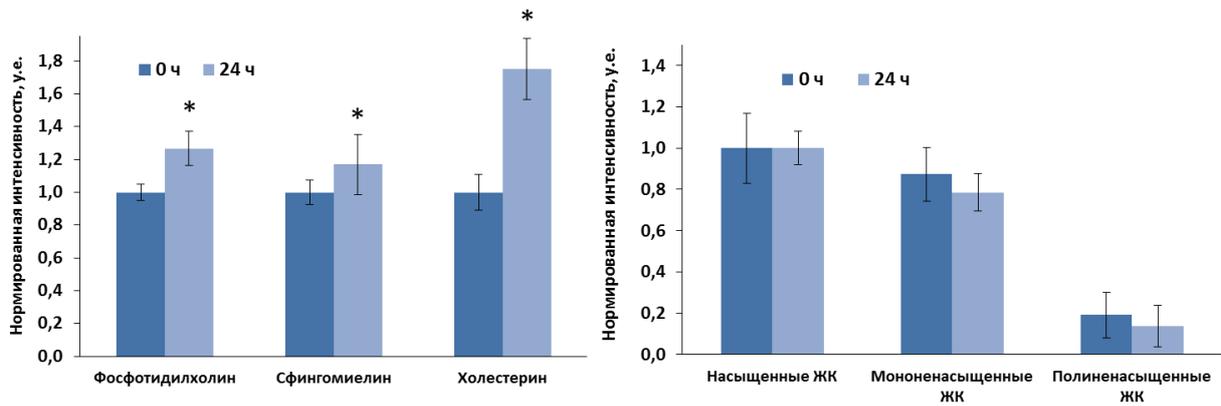


Рис. 6. Масс-спектрометрический анализ мембран СТ26 клеток до (контроль) и после 24 ч инкубации с цисплатином. Сигнал фосфатидилхолина, сфингомиелина и холестерина, сигналы нормализован от контроля. *, $p < 0,0001$ по сравнению со своим контролем без воздействия.

При воздействии оксалиплатином на клетки НСТ116 было зарегистрировано уменьшение времени жизни флуоресценции ротора на ранних сроках инкубации с препаратом (60 мин) с $3,01 \pm 0,28$ нс до $2,74 \pm 0,25$ нс, что соответствовало снижению микровязкости с 437 ± 77 сП до 366 ± 63 сП ($p < 0,005$). После 24 ч инкубации с оксалиплатином время жизни флуоресценции ротора и, соответственно, микровязкость мембран увеличились до $3,47 \pm 0,41$ нс и 593 ± 139 сП, соответственно. Для валидации полученных эффектов на микровязкость мембран, был произведен анализ вязкостных изменений химиорезистентных клеток НСТ116-OXAR при действии оксалиплатина. Время жизни флуоресценции ротора в мембранах резистентных клеток не отличалось от чувствительных клеток, и составило $3,07 \pm 0,21$ нс, что соответствует вязкости 446 ± 61 сП. Инкубация с оксалиплатином не влияла на микровязкость мембраны, при этом время жизни флуоресценции ротора и, соответственно, микровязкость составили ~ 3 нс и ~ 450 сП, соответственно. Репрезентативные изображения и количественная оценка представлены на рис. 7.

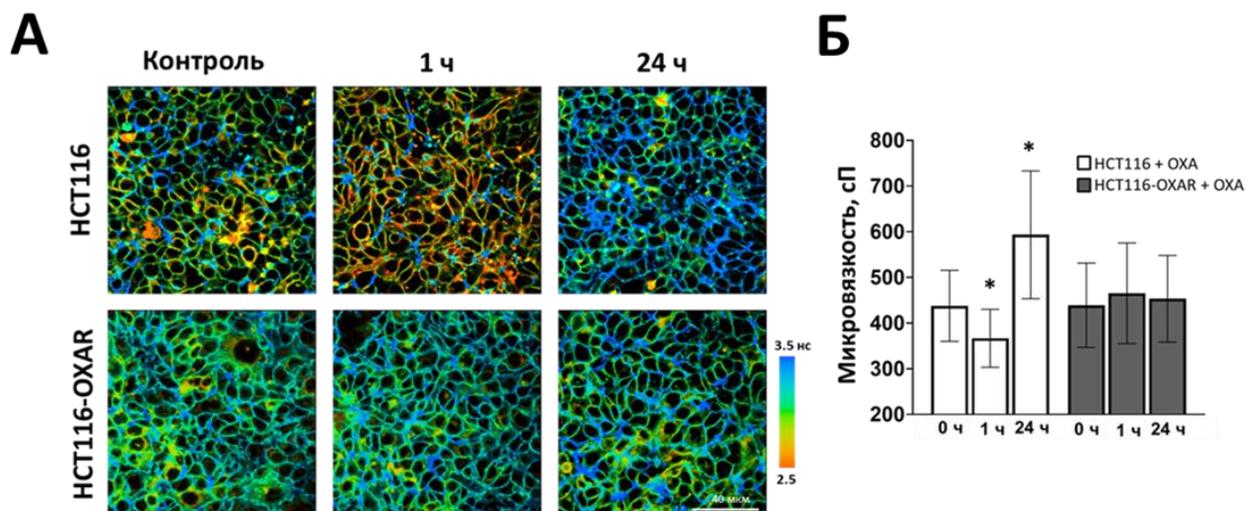


Рис. 7. Визуализация микровязкости клеточных мембран НСТ116 и НСТ116-OXAR при действии оксалиплатина. Репрезентативные изображения FLIM чувствительных и резистентных клеток НСТ116, инкубированных оксалиплатином в течение 1 ч и 24 ч и контроль без добавления (А). Количественная

оценка микровязкости плазматических мембран в клетках НСТ116 и НСТ116-ОХАР (Б). Среднее \pm SD, n = 40–50 клеток. *, $p \leq 0,005$ по сравнению с контролем.

Методом масс-спектрометрии было показано, что липидный профиль мембран клеток НСТ116 и НСТ116-ОХАР отличается. Так, у резистентных клеток был обнаружен изначально низкий сигнал фосфатидилхолина, сфингомиелина и моно- и полиненасыщенных жирных кислот, а сигнал холестерина был в несколько раз выше. Было обнаружено, что при инкубации клеток НСТ116 с оксалиплатином в течение 24 ч в мембранах снижается содержание фосфотидилхолина, моно- и полиненасыщенных жирных кислот, в то время как сигнал холестерина увеличивается (рис. 8). Липидный профиль резистентных клеток практически не изменился. Полученные результаты объясняют зарегистрированное повышение микровязкости мембран клеток и позволяют предположить, что лечение препаратами платинового ряда опухолевых клеток сопровождается не только изменением биофизических параметров, но и сложной реорганизацией липидного состава мембран.

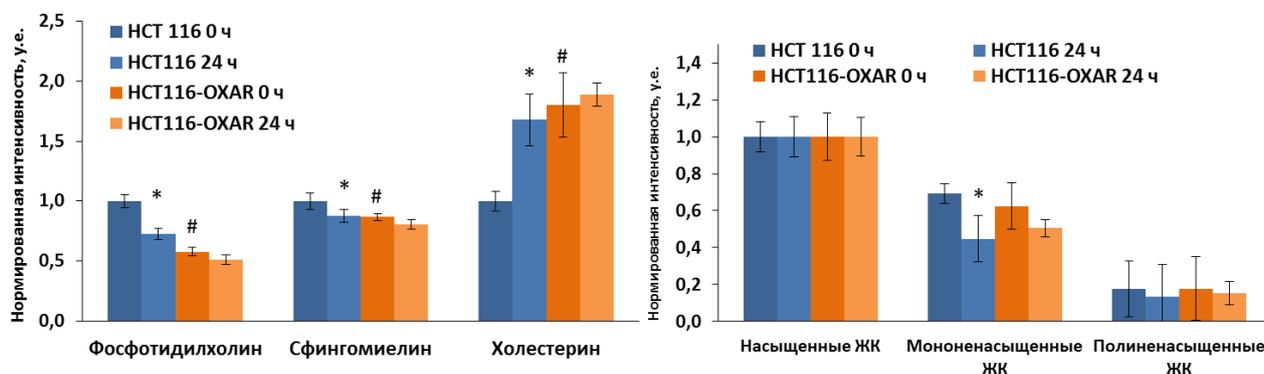


Рис. 8. Рисунок 42. Масс-спектрометрический анализ мембран чувствительных НСТ116 клеток и резистентных к оксалиплатину НСТ116-ОХАР клеток до (контроль) и в течение 24 ч воздействия оксалиплатина. Сигнал фосфотидилхолина, сфингомиелина и холестерина. Сигнал нормализован сигналом от контроля. *, $p < 0,0001$ по сравнению со своим контролем без лечения; #, $p < 0,0001$ по сравнению с чувствительным контролем.

Таким образом, в результате исследования влияния платина-содержащих препаратов на вязкостные свойства мембран опухолевых клеток в монослойных клеточных культурах *in vitro* было показано, что микровязкость мембран имеет тенденцию к понижению на ранних сроках инкубации с препаратом (10-60 мин), однако значительно повышается спустя 24 ч инкубации с препаратом. При этом микровязкость мембран резистентных клеток не меняется при действии терапевтических доз препарата. Полученный результат характерен для всех исследуемых клеточных линий. Методом масс-спектрометрии было обнаружено, что после 24 ч инкубации с оксалиплатином в мембранах чувствительных клеток снижается содержание фосфотидилхолина, моно- и полиненасыщенных жирных кислот, в то время как сигнал холестерина увеличивается, при этом в резистентных клетках липидный состав не изменяется.

2. Анализ изменений микровязкости мембран опухолевых клеток 3D сфероидов в процессе химиотерапии

Сфероиды часто используются в качестве модели солидной опухоли *in vitro*, которая имитирует ее основные структурные и функциональные особенности и профиль лекарственной устойчивости. Поскольку опухолевый сфероид представляет собой гетерогенное образование и состоит из клеток с различной пролиферативной и метаболической активностью, а также другими фенотипическими характеристиками, была исследована микровязкость мембран для сфероидов разного размера (т.е. в течение естественного роста сфероидов).

Мониторинг микровязкости проводили с 3-го по 10-ый день роста сфероидов с помощью ротатора BODIPY 2 и микроскопии FLIM (рис. 9).

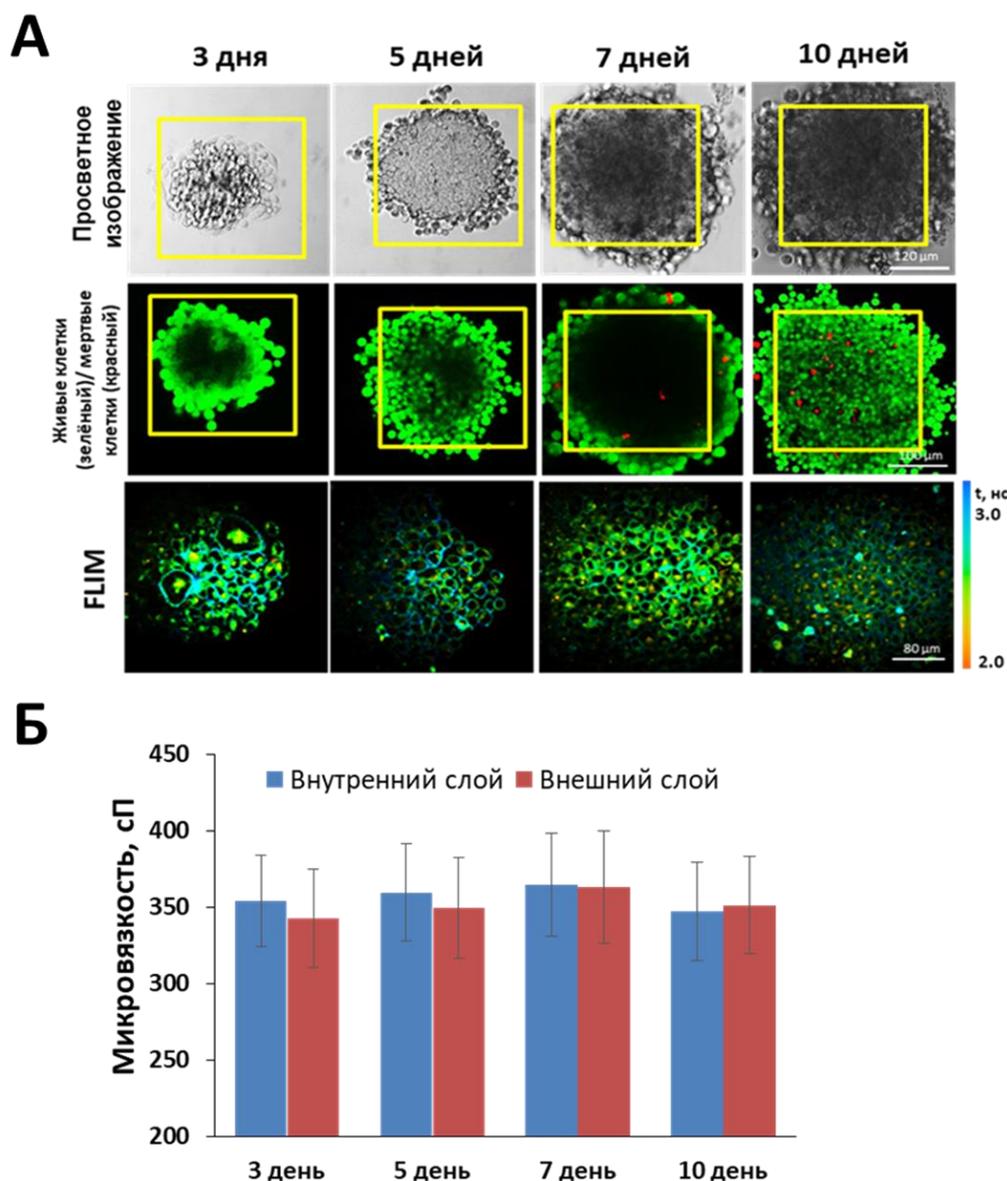


Рис. 9. Микровязкость плазматической мембраны в клетках опухолевого сфероиды HeLa Kyoto при его естественном росте с 3-го по 10-ый день. (А) Просветные изображения, результирующие изображения анализа живых (кальцеин)/мертвых (PI) клеток и FLIM изображения микровязкости мембран клеток сфероиды HeLa Kyoto. (Б) Количественная оценка микровязкости мембран клеток внутреннего и внешнего слоев сфероиды на разных стадиях его роста. Среднее \pm SD, n = 40-50 клеток.

Было показано, что микровязкость плазматических мембран в клетках сфероидов не различается для сфероидов разного размера, и между внутренним (покоящимся) и внешним (пролиферативным) клеточными слоями сфероиды, при этом время жизни флуоресценции ротатора

составляло $\sim 2,5$ нс, что соответствовало значению вязкости ~ 350 сП. Полученные данные показывают, что микровязкость мембран клеток сфероидов не зависит от метаболической активности клеток, а также от неоднородности клеточного микроокружения.

Были получены данные об изменении микровязкости плазматических мембран опухолевых клеток сфероидов при действии цисплатина. Инкубация с цисплатином привела к резкому увеличению микровязкости мембран с 336 ± 31 сП до 425 ± 25 сП через 24-48 ч инкубации ($p = 0,0005$) (рис. 10). Оценка морфологических изменений сфероидов действию препарата показала, что цисплатин не повлиял на размер и скорость роста сфероидов, однако было обнаружено увеличение количества мертвых клеток в сфероиде (PI-положительных). К 24-48 ч инкубации с цисплатином было показано, что сфероид теряет свою плотную структуру, ядро становится более светлым, а клетки периферии становятся более разрозненными.

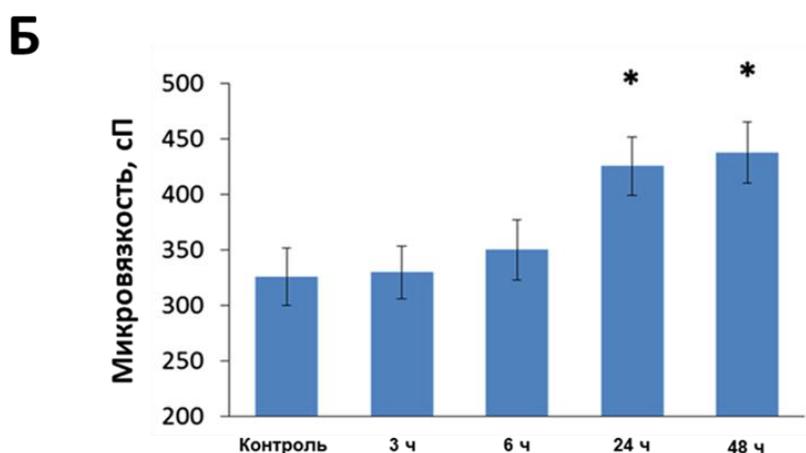
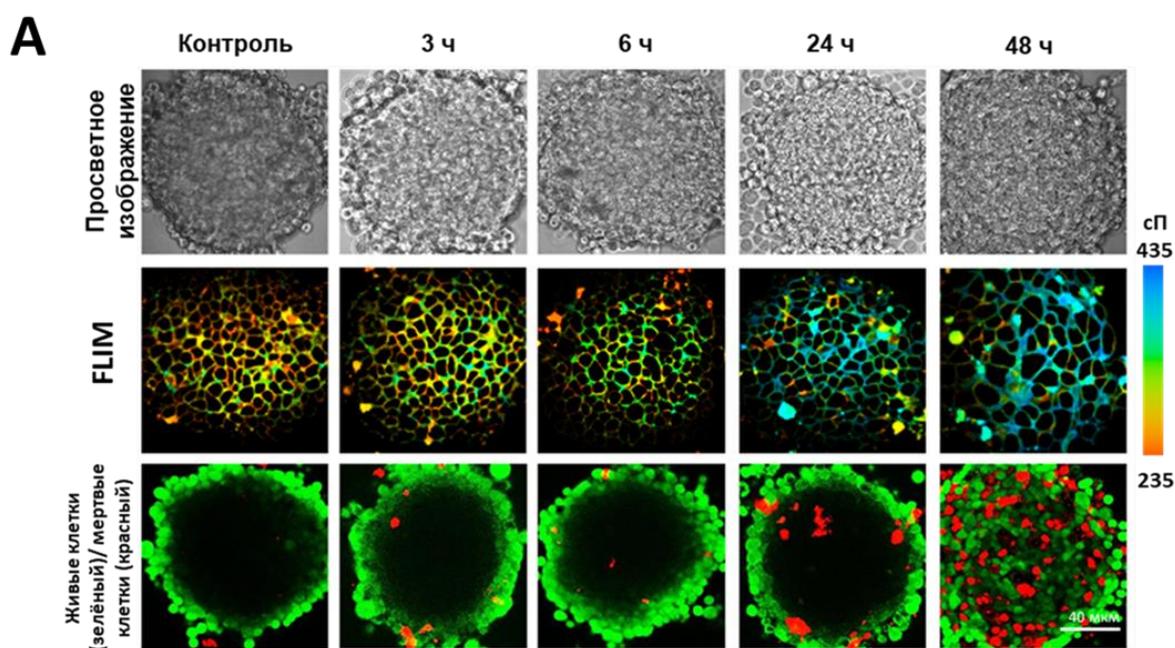


Рис. 10. Микровязкость плазматической мембраны опухолевых сфероидов HeLa Kyoto до (контроль) и в течение 48-часового воздействия цисплатином. (А) Просветные изображения, анализ живых (кальцеин)/мертвых (PI) клеток и FLIM изображения. (Б) Количественная оценка микровязкости при действии цисплатина. Среднее \pm SD, $n = 4$ сфероидов по 20 клеток в каждом. * Статистически значимая разница с контролем, $p \leq 0,005$.

Таким образом, было установлено, микровязкость мембран клеток сфероидов не меняется в процессе его естественного роста, а также одинакова в клетках внутреннего и внешнего слоя. Продемонстрировано, что вязкость мембран клеток опухолевых сфероидов увеличивалась после 24-48 ч инкубации с цисплатином.

3. Исследование микровязкости клеток опухолей животных *in vivo* при химиотерапии

С помощью молекулярного ротора BODIPY 2 и время-разрешенной флуоресцентной микроскопии FLIM были получены значения микровязкости клеток опухолевой ткани мышей СТ26 и НСТ116 *in vivo* (рис. 11). Показано, что ротор имеет моноэкспоненциальный характер затухания флуоресценции в клетках опухолей, время жизни флуоресценции для СТ26 составило $2,34 \pm 0,06$ нс, для НСТ116 – $2,57 \pm 0,10$ нс, что соответствует значениям микровязкости 265 ± 16 сП и 276 ± 22 сП, соответственно. Обнаружено, что регистрируемые времена жизни флуоресценции и, соответственно, микровязкость клеток не изменялись в течение минимум 80 мин (рис. 11).

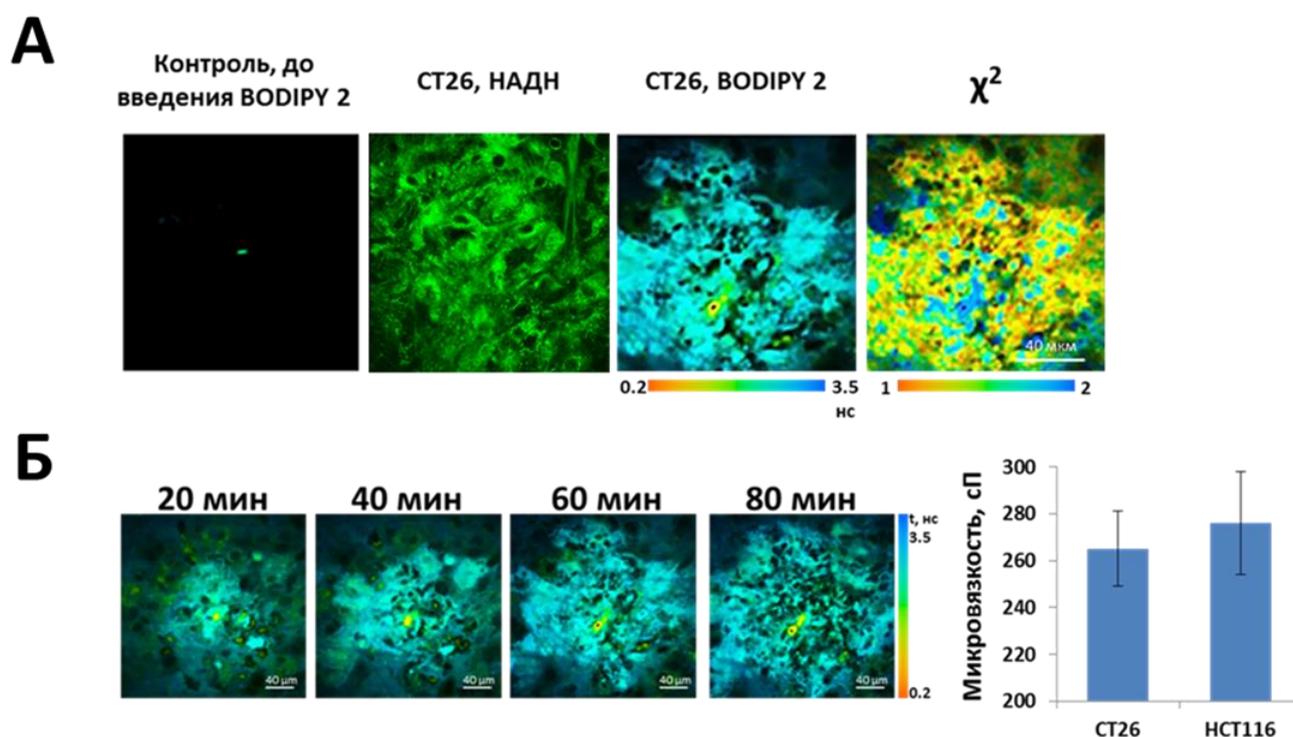


Рис. 11. Флуоресцентные и FLIM изображения опухоли СТ26 у мышей Balb/C через час после введения ротора BODIPY 2 (А) и мониторинг изменения значений времен жизни флуоресценции ротора BODIPY 2 в опухоли СТ26 в течение 80 минут (Б).

При воздействии оксалиплатином на опухоли НСТ116 было зарегистрировано ингибирование роста к 23-му дню, в то время как резистентные росли аналогично контрольным опухолям НСТ116. Гистологический анализ образцов опухолей показал, что в опухолях НСТ116 при действии оксалиплатина наблюдались обширные кровоизлияния и области некроза, в жизнеспособной ткани были обнаружены дистрофические изменения. Опухоли НСТ116-ОХАР без и после лечения по морфологическим признакам были схожи с контрольными

опухолями НСТ116. При исследовании вязкостных свойств, в нерезистентных опухолях при действии оксалиплатина было зарегистрировано повышение времени жизни флуоресценции ротора с $2,38 \pm 0,12$ нс до $2,64 \pm 0,19$ нс, что соответствовало повышению микровязкости с 268 ± 22 сП до 357 ± 44 сП (рис. 12). Воздействие оксалиплатином на химиорезистентные опухоли НСТ116-OXAR не вызывает торможения роста опухолей и не влияет на микровязкость клеток. Время жизни флуоресценции ротора и, соответственно, микровязкость сравнимы с контрольными значениями, и составили $\sim 2,4$ нс и ~ 270 сП, соответственно.

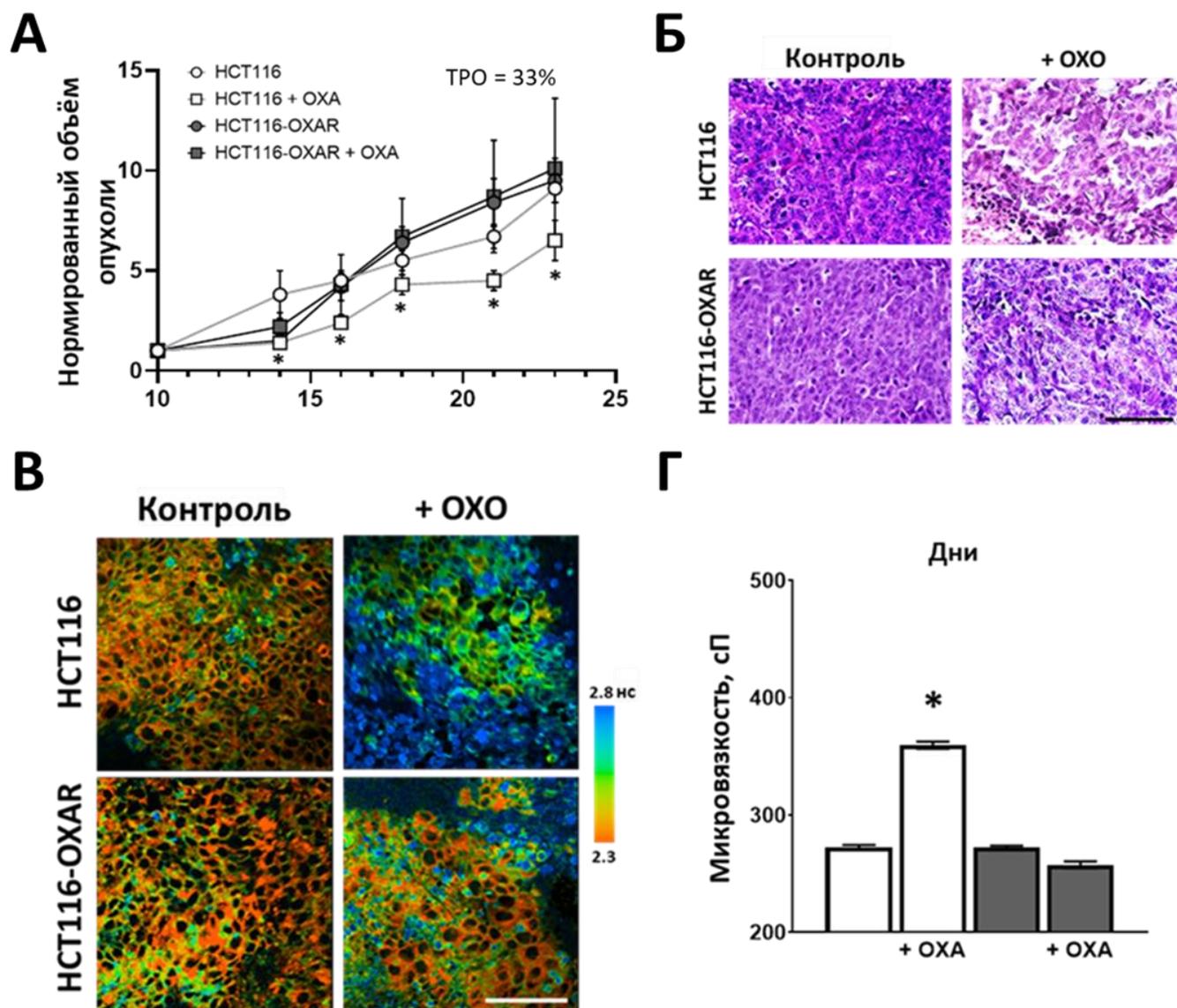


Рис. 12. Микровязкость мембран в чувствительных к оксалиплатину и резистентных опухолях. Динамика роста нелеченых опухолей НСТ116 и НСТ116-OXAR без и после действия оксалиплатина (А), объемы опухоли нормализовали к значениям 10-го дня. Среднее \pm SEM, $n = 4$ опухоли. *, $p \leq 0,05$ с контрольными опухолями НСТ116. Патоморфологические изображения опухолей НСТ116 и НСТ116-OXAR на 23-й день роста без и после воздействия оксалиплатина (Б), Н&Е-окрашивание. Бар - 100 мкм применим ко всем изображениям. Репрезентативные FLIM-изображения опухолей НСТ116 и НСТ116-OXAR in vivo без и после химиотерапии оксалиплатином Бар - 40 мкм применим ко всем изображениям (В). Количественная оценка изменения микровязкости мембран опухолей (Г). Среднее \pm SEM, $n = 4$ опухоли, 20–30 клетках в каждом поле зрения. *, $p = 0,0002$ с нелечеными опухолями НСТ116.

Таким образом, впервые был выполнен анализ микровязкости клеток опухоли *in vivo*. Показано, что при действии оксалиплатина микровязкость клеток чувствительных опухолей возрастает, в то время как микровязкость резистентных опухолей не меняется. Результаты, полученные *in vivo*, хорошо согласуются с данными *in vitro* и позволяют предположить, что повышенная микровязкость мембраны является индикатором ответа опухоли на терапию.

ВЫВОДЫ

1. С использованием адаптированных методик проведена визуализация микровязкости в монослойных клеточных культурах НСТ116, НТ29, СТ26 и HeLa Kyoto. Микровязкость мембран клеток НСТ116 составила 492 ± 33 сП, НТ29 - 478 ± 38 сП, СТ26 - 362 ± 39 сП, HeLa Kyoto - 344 ± 36 сП. Микровязкость мембран клеток опухолевого сфероиды HeLa Kyoto составила 350 ± 29 сП, что соответствует значениям, полученным для клеток монослоя *in vitro*. Впервые получены значения микровязкости клеток опухолей *in vivo*, 265 ± 19 сП для СТ26 и 276 ± 22 сП для НСТ116.

2. На культурах клеток при действии цисплатина было зарегистрировано значительное увеличение микровязкости мембран после 24 ч инкубации: с 322 ± 21 сП до 397 ± 17 сП ($p=0.00045$) для клеток СТ26, с 326 ± 22 сП до 427 ± 26 сП ($p=0.00026$) для клеток HeLa Kyoto. Наблюдаемые изменения не являются дозозависимыми. В сфероидах HeLa Kyoto было зарегистрировано увеличение микровязкости мембран с 325 ± 29 сП до 425 ± 25 сП ($p=0.00031$) через 24 ч инкубации с цисплатином.

3. Исследована микровязкость мембран клеток НСТ116 в процессе индукции резистентности к оксалиплатину длительным воздействием возрастающими дозами препарата. Было зарегистрировано повышение микровязкости мембран на дозах до 2 мкМ, с 395 ± 31 сП до 477 ± 44 сП ($p=0.00042$). При достижении дозы 8,0 мкМ было обнаружено снижение микровязкости до 423 ± 26 сП, что сопоставимо с контрольным значением - 420 ± 30 сП. При действии оксалиплатина на резистентные клетки НСТ116-ОХАР в культуре и резистентные опухоли у животных микровязкость клеток не изменялась.

4. С использованием метода время-пролетной масс-спектрометрии было обнаружено, что при действии цисплатина и оксалиплатина на опухолевые клетки в течение 24 ч наблюдается увеличение сигнала холестерина и снижение сигналов поли- и мононенасыщенных жирных кислот в мембранах. Показано, что липидный профиль мембран резистентных клеток НСТ116-ОХАР отличается от чувствительного аналога и не меняется при воздействии оксалиплатином.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из списка, рекомендованных ВАК:

1. **Shimolina** LE, Izquierdo MA, López-Duarte I, Bull JA, Shirmanova MV, Klapshina LG, Zagaynova EV, Kuimova MK. Imaging tumor microscopic viscosity in vivo using molecular rotors // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. P. 41097.
2. **Shimolina** LE, Gulin AA, Paez-Perez M, López-Duarte I, Druzhkova IN, Lukina MM, Gubina MV, Brooks NJ, Zagaynova EV, Kuimova MK, Shirmanova MV. Mapping cisplatin-induced viscosity alterations in cancer cells using molecular rotor and fluorescence lifetime imaging microscopy // *Journal of biomedical optics*. 2020. V. 25(12). P. 126004.
3. **Shimolina** L, Lukina M, Shcheslavskiy V, Elagin V, Dudenkova V, Ignatova N, Kuimova M, Shirmanova M. Probing Metabolism and Viscosity of Cancer Cells using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy // *Journal of Visualized Experiments*. 2021. V. 173. P. 62708.
4. Shirmanova MV, **Shimolina** LE, Lukina MM, Zagaynova EV, Kuimova MK. Live cell imaging of viscosity in 3D tumour cell models // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017. V. 1035. P. 143-153.
5. **Shimolina** L, Potekhina E, Druzhkova I, Lukina M, Dudenkova V, Belousov V, Shcheslavskiy V, Zagaynova E, Shirmanova M. Fluorescence lifetime-based pH mapping of tumors in vivo using new genetically encoded sensor SypHerRed // *Biophysical Journal*. 2022. S0006-3495(22)00185-0/
6. **Shimolina** L, Gulin A, Ignatova N, Druzhkova I, Gubina M, Lukina M, Snopova L, Zagaynova E, Kuimova MK, Shirmanova MV. The Role of Plasma Membrane Viscosity in the Response and Resistance of Cancer Cells to Oxaliplatin // *Cancers*. 2021. V. 13(24). P. 6165.

Тезисы конференций:

1. Ширманова МВ, **Шимолина** ЛЕ, Куимова МК, Клапшина ЛГ, Загайнова ЕВ. Измерение вязкости опухолевых клеток с использованием молекулярных роторов и FLIM // Сборник тезисов конференции «Современные методы флуоресцентного молекулярного имиджинга (ADFLIM)», 2016. С. 8.
2. **Шимолина** ЛЕ, Ширманова МВ, Куимова МК, Клапшина ЛГ, Загайнова ЕВ. Анализ фармакокинетики молекулярного ротора Bodipy-C10 и микровязкости опухолевых клеток in vivo // Сборник тезисов 20-й Международной Пущинской школы-конференции «Биология – наука XXI века». 2016. С. 296.
3. **Шимолина** ЛЕ, Ширманова МВ, Куимова МК, Клапшина ЛГ, Загайнова ЕВ. Изучение микровязкости опухолевых клеток СТ26 в исследованиях in vitro и in vivo // Сборник тезисов 69-ой Всероссийской школе-конференции молодых учёных, посвящённой 100-летию Университета Лобачевского и биологического факультета (ИББМ) «Биосистемы: организация, поведение, управление», 2016. С. 177.
4. **Shimolina** LE, Shirmanova MV, Kuimova MK, Zagaynova EV. Measuring microviscosity of normal and cancer cells using the fluorescent molecular rotor Bodipy 2 in vitro // Сборник тезисов 1-ой Международной Школе ADFLIM для молодых учёных, аспирантов и студентов, 2016. С. 8-9.
5. **Shimolina** LE, Shirmanova MV, Kuimova MK, Zagaynova EV. Imaging tumor microscopic viscosity in vivo using molecular rotors // Сборник тезисов 2-ой Международной Школе ADFLIM 2 для молодых учёных, аспирантов и студентов. 2017. С. 10.
6. **Шимолина** ЛЕ, Куимова МК, Лукина ММ, Игнатова НИ, Ширманова МВ. Изучение микровязкости опухолевых клеток в зучение микровязкости опухолевых клеток в 3D культуре с помощью молекулярного ротора Bodipy 2 при химиотерапии // Медиаль, тезисы III Всероссийской 14-ой Межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем медицины». 2017. Т. 1(19). С. 374.
7. **Шимолина** ЛЕ, Ширманова МВ. Изучение микровязкости клеток и соединительной ткани опухоли с помощью флуоресцентных молекулярных роторов in vivo // Сборник тезисов XXIV

Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». 2017. Опт. Диск. Р. 1.

8. **Шимолина** ЛЕ, Дружкова ИН, Куимова МК, Ширманова МВ. Исследование вязкости опухолевых клеток и соединительной ткани с помощью флуоресцентных молекулярных роторов *in vivo* // Тезисы докладов 70-ой Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых учёных «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2017. С. 177.

9. Shirmanova MV, Lukina MM, Druzhkova IN, Sergeeva TF, **Shimolina** LE, Snopova LB, Dudenkova VV, Gavrina AI, Kuimova MK, Shcheslavskiy VI, and Zagaynova EV. Tumor response to chemotherapy as a complex phenomenon: insight into morphofunctional characteristics using fluorescence imaging // VI International Symposium Topical problems of biophotonics. 2017. P. 103.

10. Shirmanova MV, Lukina MM., **Shimolina** LE, Kuimova MK, Dudenkova VV, Shcheslavskiy VI, Zagaynova EV. Probing energy metabolism and microviscosity in cancer using FLIM // Optics InfoBase Conference Papers. 2017. V. Part F61-ECBO. 137548

11. **Шимолина** ЛЕ, Ширманова МВ, Куимова МК, Лукина ММ, Игнатова НИ. Изучение изменения микровязкости мембран опухолевых клеток в 3D культуре с помощью молекулярного ротора BODIPY и микроскопии FLIM при противоопухолевом лечении // Материалы XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2018», Санкт Петербург, РИЦ ПСПбГМУ. 2018. С. 259-260.

12. **Шимолина** ЛЕ, Ширманова МВ, Куимова МК, Лукина ММ, Загайнова ЕВ. Изучение вязкостных свойств опухолевых клеток в системах *in vitro* // Тезисы докладов «Биосистемы: организация, поведение, управление» 71-я Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых, Н. Новгород, Университет Лобачевского. 2018. 247 с.

13. **Шимолина** ЛЕ, Куимова МК, Лукина ММ, Игнатова НИ. Исследование микровязкости живых опухолевых клеток в 3D культуре с помощью молекулярного ротора и микроскопии FLIM при противоопухолевом лечении // Клинический случай. Научный студенческий журнал, Сборник тезисов Научной Сессии молодых учёных и студентов «Медицинские этюды». 2018. С. 308-309.

14. **Shimolina** L, Shirmanova M, Lukina M, Ignatova N, Zagaynova E. Luminescence lifetime imaging of tumor spheroid heterogeneity // Сборник тезисов 4th International Conference Current Trends in Cancer Theranostics. 2018. P. 70.

15. **Шимолина** ЛЕ, Ширманова МВ, Куимова МК, Лукина ММ, Загайнова ЕВ. Анализ микровязкости опухолевых клеток Hela Kyoto в системах *in vitro* // Сборник тезисов конференции «XXIII Нижегородская сессия молодых ученых (технические, естественные, математические науки)». 2018. С. 175-176.

16. Shirmanova MV, Lukina MM, **Shimolina** LE, Dudenkova VV, Klapshina LG, Kuimova MK, Zagaynova EV. Metabolic state and microviscosity of cancer cells as indicators of response to chemotherapy // Book of Abstracts of the 11th workshop and conference on advanced multiphoton and fluorescence lifetime imaging techniques FLIM. 2017.

17. Lukina MM, **Shimolina** LE, Druzhkova IN, Ignatova NI, Reunov DG, Zagaynov VE, Komarov DV, Medyanik IA, Kritchenkov IS, Zagaynova EV, Shirmanova MV. Metabolic imaging of tumor samples from patients // VII International Symposium Topical problems of biophotonics. 2019. P. 152-153.

18. **Шимолина** ЛЕ, Ширманова МВ, Куимова МК, Лукина ММ, Игнатова НИ, Загайнова ЕВ. Изучение вязкости цитоплазматической мембраны опухолевых клеток с помощью флуоресцентного молекулярного ротора и время-разрешённой микроскопии FLIM при химиотерапии // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России. 2019. С. 274.

19. **Шимолина** ЛЕ, Лукина М.М., Игнатова Н.И., Ширманова М.В. Анализ вязкостных изменений цитоплазматической мембраны клеток колоректального рака при химиотерапии // Сборник тезисов V Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием. Материалы конференции. 2019. С. 467-468.

20. **Шимолина** ЛЕ, Ширманова МВ, Бобров НВ, Лукина ММ, Загайнова ЕВ. Исследование метаболических особенностей колоректального рака на образцах опухолей человека //

Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы докладов 72-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. 2019. С. 254.

21. **Шимолина** ЛЕ, Ширманова МВ, Куимова МК, Лукина ММ, Игнатова НИ, Загайнова ЕВ. Визуализация изменения микровязкости мембран опухолевых клеток с помощью флуоресцентных молекулярных роторов и микроскопии FLIM в процессе химиотерапии // Медицинская физика (ТКМФ-7). Сборник тезисов VII Троицкой конференции с международным участием. Москва, 2020. С. 61-62.

22. **Шимолина** ЛЕ, Ширманова МВ, Куимова МК, Лукина ММ, Игнатова НИ, Дружкова ИН, Загайнова ЕВ. Анализ изменения микровязкости плазматической мембраны в раковых клетках в процессе противоопухолевого лечения // Белые ночи 2020. тезисы VI Петербургского международного онкологического форума. 2020. С. 320.

23. **Шимолина** ЛЕ, Лукина ММ, Дуденкова ВВ, Дружкова ИН, Куимова МК, Ширманова МВ, Загайнова ЕВ. Разработка методов FLIM визуализации вязкости мембраны и цитоплазматического pH опухолевой клетки в процессе ее жизнедеятельности // XXV Нижегородская сессия молодых ученых (технические, естественные, гуманитарные науки). материалы тезисов и докладов. Нижний Новгород, 2020. С. 224-225.

24. Shirmanova MV, Lukina MM, **Shimolina** LE, Kuimova MK, Dudenkova VV, Shcheslavskiy VI, Zagaynova EV. Probing energy metabolism and microviscosity in cancer using FLIM // Progress in Biomedical Optics and Imaging. 2017. V. 10411. P. 1041102.

25. **Shimolina** LE, Shirmanova MV, Kuimova MK, Lukina MM, Ignatova NI, Druzhkova IN, Zagaynova EV. Imaging plasma membrane microviscosity in cancer cells during chemotherapy // Progress in Biomedical Optics and Imaging. 2020. V. 11244. P. 112442.

26. **Шимолина** ЛЕ, Ширманова МВ, Лукина ММ, Дружкова ИН, Игнатова НИ, Загайнова ЕВ. Измерение внутриклеточного pH с использованием генетически-кодируемых сенсоров в системах in vitro // Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Нижний Новгород, 2020. С. 233.

27. **Шимолина** ЛЕ, Игнатова НИ, Лукина ММ, Куимова МК, Ширманова МВ. Динамические изменения микровязкости плазматической мембраны раковых клеток в ответ на химиотерапию // VII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием "VolgaMedScience", Нижний Новгород, 2021. С. 78-80.

28. **Шимолина** ЛЕ, Хлынова АЭ, Лукина ММ, Игнатова НИ, Куимова МК, Загайнова ЕВ, Ширманова МВ. Визуализация методом FLIM вязкостных изменений мембран опухолевых клеток при химиотерапии // XXVI Нижегородская сессия молодых ученых (технические, естественные науки). Материалы конференции. Нижний Новгород, 2021. С. 174-175.

29. **Shimolina** L, Hlynova A, Lukina M, Ignatova N, Kuimova M, Zagaynova E, Shirmanova M. Visualization of viscous changes of membranes of tumor cell during chemotherapy // Advanced Laser Technologies 2021, Moscow, Russia, Book of abstracts. 2021. P. 116.