

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

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

На правах рукописи

Шимолина Любовь Евгеньевна

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

1.5.2 - биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Научный консультант:
д.м.н., член-корр. РАН
Загайнова Е. В.

Нижегород – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. Обзор литературы.....	13
1.1 Вязкость и её значение для живой клетки.....	13
1.2 Особенности вязкости опухолевых клеток.....	21
1.3 Роль микровязкости мембран опухолевых клеток в ответе на химиотерапию.....	25
1.4 Методы измерения вязкости.....	32
1.4.1 Флуоресцентные молекулярные ротаторы.....	35
1.4.2 Флуоресцентная время-разрешённая микроскопия FLIM.....	45
Глава 2. Материалы и методы.....	48
2.1 Объекты исследования.....	48
2.2 Методы и методики исследования.....	51
Глава 3. Результаты и их обсуждение.....	62
3.1 Оценка микровязкости мембран опухолевых клеток в процессе химиотерапии на монослойных культурах.....	62
3.1.1 Адаптация методики оценки микровязкости цитоплазматических мембран опухолевых <i>in vitro</i> с использованием молекулярного ротатора BODIPY 2 и микроскопии FLIM.....	62
3.1.2 Исследование изменений микровязкости мембран опухолевых клеток СТ26 и HeLa Kyoto при действии цисплатина.....	68
3.1.3 Изучение влияния оксалиплатина на микровязкость мембран химиочувствительных и резистентных клеток.....	71

3.2 Анализ изменений микровязкости мембран опухолевых клеток 3D сфероидов в процессе химиотерапии	75
3.2.1 Адаптация методики визуализации микровязкости мембран опухолевых клеток сфероидов с использованием ротора BODIPY 2 и микроскопии FLIM	75
3.2.2 Анализ изменений микровязкости мембран клеток опухолевых сфероидов при действии цисплатина.....	79
3.3 Исследование микровязкости клеток опухолей животных <i>in vivo</i> при химиотерапии	81
3.3.1 Исследование биораспределения и фармакокинетики флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 в организме мыши с опухолью СТ26	81
3.3.2 Адаптация методики измерения микровязкости клеток опухолей мышей <i>in vivo</i> при помощи флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 и метода FLIM.....	84
3.3.3 Исследование микровязкости чувствительных и резистентных опухолевых клеток <i>in vivo</i> при действии оксалиплатина	86
3.4 Анализ липидного состава мембран опухолевых клеток при химиотерапии методом масс-спектрометрии ToF-SIMS.....	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	98
ВЫВОДЫ	101
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	103

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФДТ – Фотодинамическая терапия

ЭПР - Электронный парамагнитный резонанс

BODIPY- Boron-dipyrrromethene – Флуоресцентный молекулярный ротор на основе бор-дипиррометена

DMPC – Dimyristoylphosphatidylcholine – Димиристоилфосфатидилхолин

DOPS - Dioleoylphosphatidylserine – Диолеоилфосфатидилсерин

DMABN - 1,4-диметиламинобензонитрил

DPH - 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен

EPR – Enhanced permeability and retention effect - Эффект повышенной проницаемости и удержания

LUV - Large unilamellar vesicle - Большая однослойная везикула

FLIM - Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy – Флуоресцентная микроскопия с временным разрешением

FRAP - Fluorescence recovery after photobleaching - Восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания

LPCAT2 - ЛизоRS-ацилтрансфераза 2

RCD - Моно-(6-О-п-толуолсульфонил)-циклодекстрин

PBS – Phosphate buffered saline – Фосфатно-солевой буфер

PEG – Полиэтиленгликоль

ФЭУ – Фотоэлектронный умножитель

CCD - Прибор с зарядовой связью

TICT - Twisted Intramolecular Charge Transfer - Состояние с внутримолекулярным скручиванием и переносом заряда

TCSPC – Time-Correlated Single Photon Counting – Время-коррелированный счёт одиночных фотонов

DMEM – среда для культивирования клеток

FBS – Fetal bovine serum – Фетальная бычья сыворотка

SPF – Specific Pathogen Free – без патогенов

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

PI – Propidium iodide – Пропидиумом иодидом

YFP – Yellow fluorescent protein – Жёлтый флуоресцентный белок

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Клеточная мембрана образует барьер, необходимый для сохранения целостности и нормального функционирования клетки. Микровязкость мембран является одним из важнейших биофизических параметров клетки, поскольку ее изменение может быть связано с серьезными нарушениями морфологического или физиологического состояния. Микровязкость мембран влияет на скорость диффузии, транспорт молекул, активность мембранных ферментов, синтетические процессы [1-3]. Кроме того, от вязкости зависят эластические свойства мембраны, которые вовлечены во множество морфологических преобразований, включая деление, дифференцировку, миграцию. Изменение вязкости мембран на клеточном уровне характерно для некоторых заболеваний, в том числе онкологических [4].

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 [5-6]. Показано, что состав и количество жирных кислот, фосфолипидов и содержание холестерина различаются в нормальных и опухолевых клетках [7]. Также известно, что вязкость опухолевых клеток изменяется в процессе терапии (фотодинамической и химиотерапии) и при развитии химиорезистентности [8-11]. Несмотря на фундаментальное значение вязкости 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 окружающей их среды. Благодаря своим уникальным физико-химическим

свойствам флуоресцентные молекулярные роторы являются привлекательными инструментами для решения задачи измерения вязкости живых клеток.

FLIM с молекулярными роторами дает возможность не только количественно оценить микровязкость отдельных компартментов живой клетки с высоким пространственным разрешением в реальном времени, но и получать пространственную карту микровязкости клеток. Данный подход является достаточно новым, и биологические исследования с применением флуоресцентных молекулярных роторов на сегодняшний день ограничены только несколькими работами *in vitro* [12-17], тогда как исследований *in vivo* не проводилось. Исходя из этого, разработка методик оценки 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:

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 вязкости 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 вязкости опухолевых клеток в модельных 3D опухолевых сфероидов 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 вязкость мембран опухолевых клеток увеличивается в результате терапии цисплатином и оксалиплатином и не изменяется в резистентных клетках.
3. Впервые установлено, что увеличение вязкости 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 ротора и метода FLIM. Показаны изменения вязкости 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 диссертации, выносимые на защиту

1. Адаптированные методики измерения микровязкости мембран с использованием флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 и метода FLIM предоставляют возможность анализировать микровязкость мембран живых опухолевых клеток в моделях на разных уровнях организации: клеточном монослое, 3D опухолевых сфероидах 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.

Личное участие 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.

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 нанoeлектроники (г. Нижний Новгород, 2022).

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 источника, из них 131 зарубежный.

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.

Конкурсная поддержка

Проведенные исследования поддержаны проектами: РФФИ № 15-02-05189 «Разработка метода измерения вязкости опухолевых клеток *in vivo* с помощью флуоресцентных молекулярных роторов различной природы и их солюбилизованных форм»; РФФИ № 18-29-09054 «Разработка мультимодального способа оценки химиорезистентности опухолей с помощью флуоресцентной время-разрешенной микроскопии и молекулярного химического картирования»; РФФИ № 20-14-00111 «Исследование микровязкости мембран опухолевых клеток с помощью молекулярных роторов и флуоресцентной время-разрешенной микроскопии и ее роли в ответе на противоопухолевую терапию»; РФФИ №19-32-90139 «Измерение внутриклеточного pH и вязкости опухолевых клеток с помощью время-разрешенного флуоресцентного имиджинга (FLIM)».

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Вязкость и её значение для живой клетки

Вязкость (обратная величина текучести) – это свойство текучих тел оказывать сопротивление перемещению одной их части относительно другой. В зависимости от масштаба области измерения вязкости различают нановязкость, микровязкость, локальную вязкость, интегральную вязкость. С физической точки зрения, микровязкость – это трение, испытываемое одной частицей при её взаимодействии в процессе диффузии с окружающей средой в масштабе микрометра длины.

Известно, что микровязкость является одним из важнейших параметров биологических систем, поскольку ее изменение может быть связано с серьезными нарушениями морфологического или физиологического состояния живой клетки. Изменение значения микровязкости в живой клетке может существенно отразиться как на скорости чисто химических реакций, так и на ряде физических явлений, имеющих первостепенное значение для процессов, происходящих в клетке. Например, изменение микровязкости влияет на диффузию химических веществ, скорость Броуновского движения, электропроводность и др. Микровязкость вносит большой вклад в такие процессы, как внутриклеточный сигналинг и транспорт, диффузия короткоживущих интермедиатов и метаболитов (например, активных форм кислорода и азота), синтетические процессы, каталитическую активность многих ферментов и др. [3].

Микровязкость является одним из важнейших свойств жидкого содержимого клетки - цитоплазмы. Вязкостные свойства цитоплазмы обусловлены структурой составляющих её биополимеров и субклеточных образований и зависит от степени дисперсности и гидратации коллоидов, содержания воды в клетке, температуры и других факторов. От микровязкости цитозоля зависит интенсивность протекания большинства внутриклеточных процессов [18]. Это свойство

цитоплазмы тесно связано с обменом веществ: чем выше вязкость, тем обычно менее интенсивно идут обменные процессы. Так, с возрастанием микровязкости уменьшается скорость диффузии, падает электропроводность, замедляется вплоть до полной остановки Броуновское движение [1-2]. Меньшая микровязкость цитоплазмы благоприятствует протеканию синтетических процессов, внутриклеточному транспорту веществ, но понижает устойчивость клеток к неблагоприятным внешним условиям. При большей вязкости цитозоля медленнее идут физиологические процессы, что повышает устойчивость клетки к неблагоприятным условиям внешней среды.

Клеточные мембраны образуют барьер между компартментами клетки, но через который проходит множество химических реакций, необходимых для нормального существования и функционирования клетки. Клеточная мембрана является уникальным компонентом клетки, она выступает не только в качестве барьера, но и рецепторным портом, регулятором ферментативной активности, эндоцитоза и внутриклеточного транспорта, будучи ответственной за взаимодействие между клеткой и окружающей средой [19]. Мембрана состоит из двойного слоя молекул липидов, основная масса которых представляет собой— фосфолипиды. В своём составе фосфолипиды содержат гидрофильную и гидрофобную части. Кроме этого, в состав биологических мембран входят различные белки, выполняющие множество функций — интегральные, полуинтегральные, поверхностные.

Клеточные мембраны представлены жидкостно-мозаичной моделью благодаря тому, что, с одной стороны, бислоем фосфолипидов текучий, и отдельные фосфолипиды могут перемещаться внутри мембраны, с другой стороны, в бислое встроены белки, что приводит к мозаичному распределению компонентов в мембране (рис. 1). Мозаичная структура помогает плазматической мембране оставаться достаточно жидкой. Таким образом, клеточные мембраны достаточно

текучие, то есть они не фиксированы в своем положении и могут принимать аморфные формы.

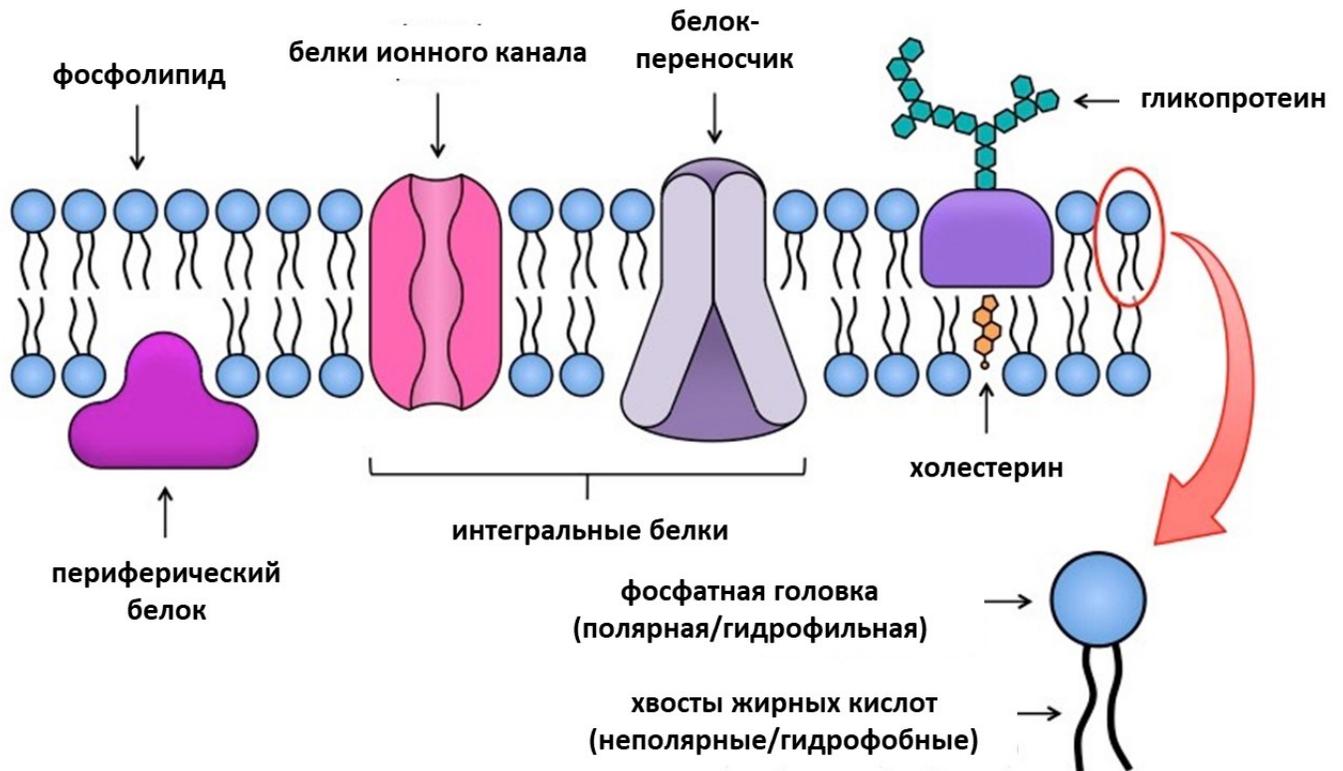


Рисунок 1. Структура клеточной мембраны.

Микровязкость мембраны (англ. *membrane microviscosity*) является важным биофизическим параметром клеточной мембраны, поскольку участвует в контроле транспорта молекул, каталитической активности мембранных ферментов, проницаемости для диффундирующих веществ, процессов синтеза. Значимый вклад в значение микровязкости мембраны вносят три сложных типа движения в мембране. Неоднородное латеральное движение в плоскости липидного бислоя является основным движением в мембране. Это движение может быть осложнено кластеризацией липидов различного состава и свойств, скоплением белков и белковых комплексов, а также взаимодействием с подмембранным цитоскелетом клетки. Существенный вклад вносит и вращательное движение вокруг продольной оси молекулы, третий вид движения — трансмембранное движение или флип-флоп.

Отмечается, что липиды находятся в постоянном движении посредством броуновского движения, а белки мембраны также движутся, но медленнее, чем окружающие их липиды [20].

Продемонстрировано, что биофизические параметры мембраны, главным образом микровязкость липидного бислоя, самым непосредственным образом влияет на процессы обмена веществ в клетках, так как регулирует проницаемость мембран и каталитическую активность многих мембранных ферментов, переносчиков и рецепторов [21]. Поддержание надлежащей микровязкости мембраны имеет важное значение для протекания процессов диффузии и транспорта веществ, а также влияет на динамику и функцию многих интегральных белков мембраны. Эластические свойства мембраны также во многом обусловлены значением микровязкости, что в свою очередь необходимо для множества морфологических преобразований, которые необходимы для нормального функционирования клеток, включая деление, дифференциацию и общую адаптацию к изменениям окружающей среды [20-21].

Микровязкость мембран представляет собой сложный параметр, на который влияют как некоторые биофизические (температура, электрические заряды, pH), так и биохимические факторы (соотношение белок/фосфолипиды, соотношение фосфолипиды/холестерин, степень ненасыщенности жирных кислот). В свою очередь микровязкость мембран обуславливает интенсивность многих мембранных процессов, особенно транспорт веществ.

На пассивный транспорт непосредственно влияет липидный состав мембраны и, следовательно, микровязкость мембраны или взаимодействие каналов и молекул-переносчиков с соседними мембранными липидами [12, 22-23]. Мембранная диффузия связана как с гидрофобной природой частиц, так и с мембранным окружением. Различные типы жирных кислот влияют на функцию многих каналов, стимулируя или ингибируя их. Эти эффекты могут быть опосредованы прямым связыванием липидов с каналом или косвенными гидрофобными взаимодействиями. Конформация активных транспортных насосов

может модулироваться также за счет взаимодействий с соседними липидами бислоя (особенно холестерина) и организации мембранных микродоменов – липидных рафтов. Таким образом, микровязкость мембран тесно связана как с пассивным, так и с активным транспортом.

Известно, что холестерин придает биологической мембране более вязкие свойства, а ненасыщенные жирные кислоты, напротив, делают мембрану более текучей [24-25]. Увеличение в мембранах насыщенных жирных кислот в фосфолипидах также повышает микровязкость мембран [25]. Хвосты фосфолипидов, состоящие из насыщенных жирных кислот, имеют линейную цепочку, что позволяет им легкоупаковываться вместе или с холестерином в мембране. Ацильные цепи ненасыщенных жирных кислот, которые входят в состав фосфолипидов, наоборот, имеют изгибы вдоль своей длинной оси в положении двойных связей и, следовательно, плохо упаковываются [26-27]. Таким образом, высокое содержание ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах мембран увеличивает степень текучести мембран.

В дополнение, длина углеводородных цепей фосфолипидов играет важную роль в вязкостных свойствах мембран. Так, с увеличением длины ацильной цепи повышается микровязкость мембран (рис. 2) [26]. Было отмечено, что чем выше подвижность хвостов фосфолипидов, тем меньше микровязкость мембран, и тем лучше их проницаемость для диффундирующих молекул [1]. Немаловажным фактором, влияющим на вязкость мембран является температура плавления этих жирных кислот. Температура плавления жирной кислоты обратно пропорциональна длине цепи, и она дополнительно снижается за счет двойных связей в ненасыщенных жирных кислотах [26-27]. Таким образом, жирные кислоты являются важными структурными компонентами клеточной мембраны и играют важную роль не только во внутриклеточном метаболизме и сигнальных каскадах, но и имеют решающее значение в регуляции биофизических параметров мембраны, в частности микровязкости.

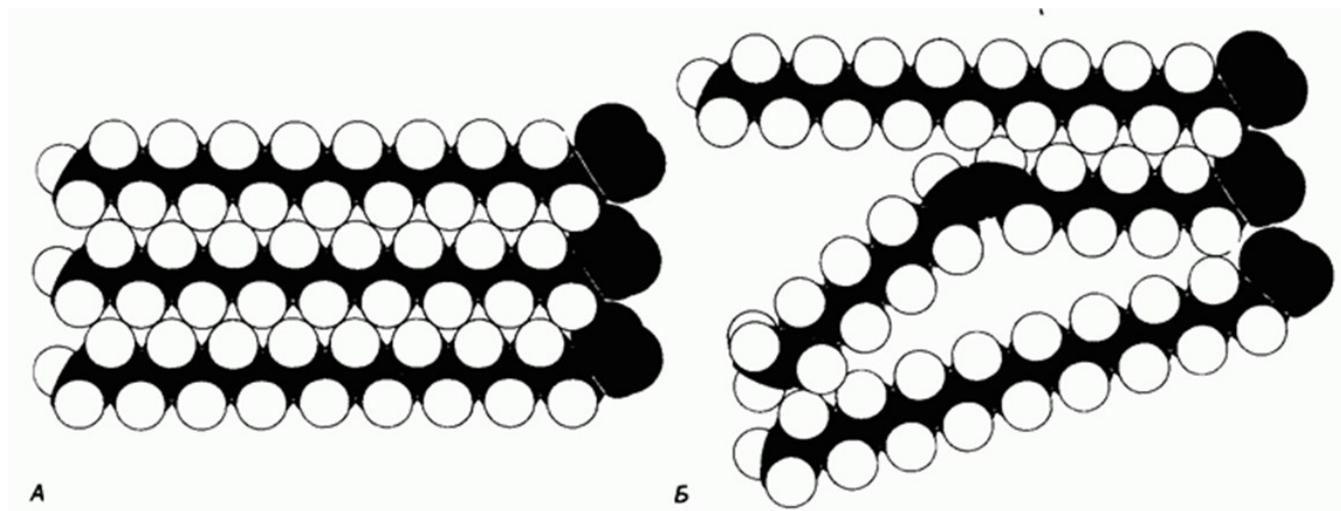


Рисунок 2. Степень упорядоченности упаковки углеводородных цепей жирных кислот, А – трёх молекул стеариновой кислоты (насыщенная), Б – олеиновой кислоты (ненасыщенная) между двумя молекулами стеариновой кислоты.

Одними из главных образующих мембрану липидов являются фосфотидилхолин и сфингомиелин (рис. 3). Жирные кислоты, входящие в состав этих фосфотидилолинов, неравноценны. Ко второму атому углерода присоединена мононенасыщенная жирная кислота. При первом углероде находится насыщенная жирная кислота. В сфингомиелине обе жирные кислоты являются насыщенными. Так, фосфотидилхолин придает мембране текучие свойства, в то время как сфингомиелин повышает вязкость мембраны. Вместе с холестерином фосфолипиды формируют липидный бислой клеточных мембран, обеспечивают активность мембранных ферментов, вязкость и проницаемость мембран. Фосфолипиды влияют на функционирование рецепторов, могут регулировать их число [26].

В качестве модификатора биологической мембраны выступает холестерин, который придает мембране определенную жесткость, структурирует её и увеличивает плотность упаковки липидов (рис. 3). Следовательно, холестерин является стабилизатором текучести мембран живых клеток. Холестерин обладает способностью изменять мембранную микровязкость, встраиваясь между хвостами

жирных кислот, при этом ингибируя переход мембраны в состояние твердого геля, но в то же время укрепляя жидкие мембраны за счет снижения гибкости соседних хвостов ненасыщенных жирных кислот [28-29]. В дополнение, плазматическая мембрана клеток очень неоднородна, содержит много плотных специфических участков - липидных рафтов.

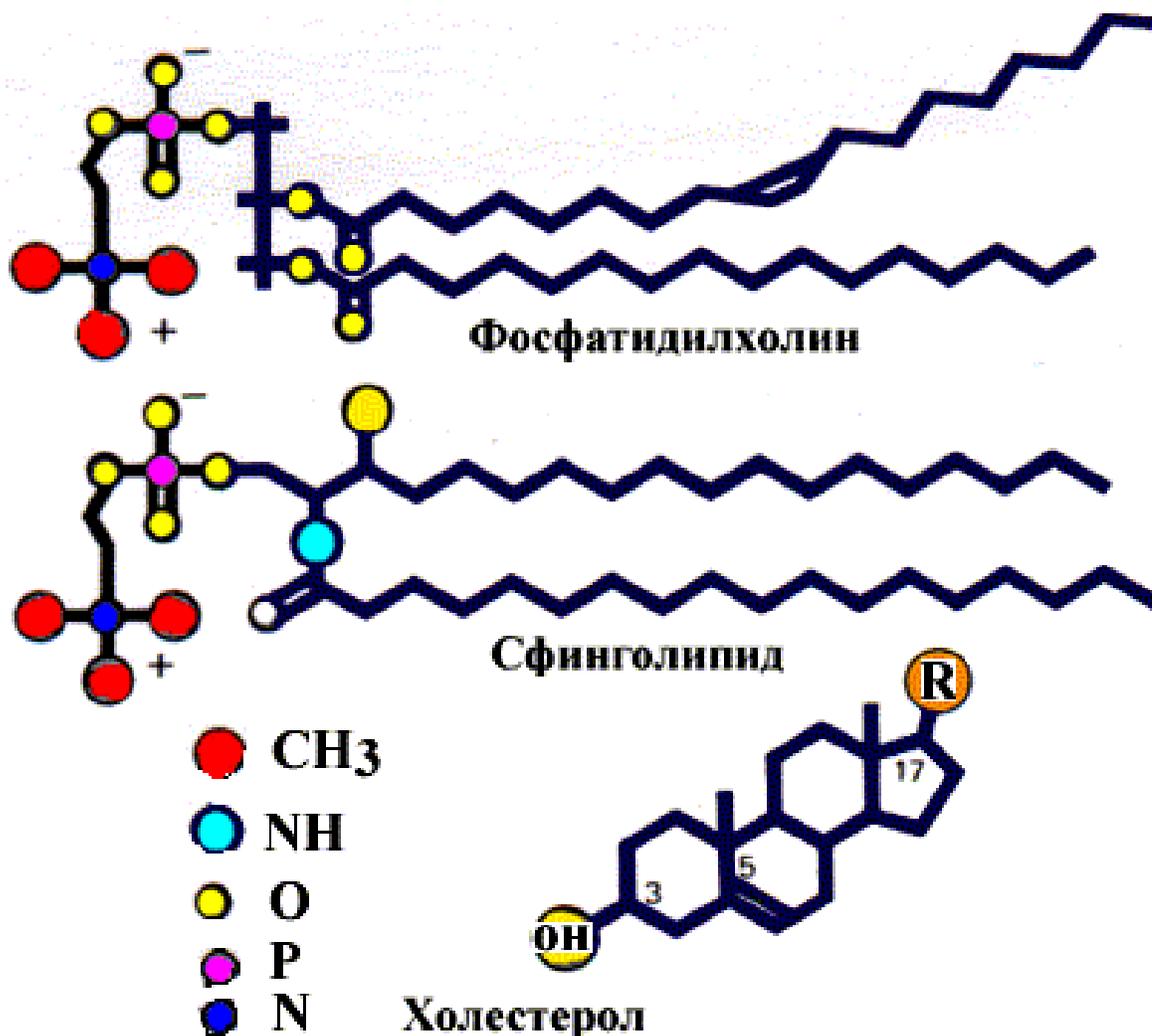


Рисунок 3. Структурные формулы фосфатидилхолина, сфингомиелина и холестерина.

Ещё в 1997 году была выдвинута гипотеза о существовании липидных рафтов, определяемых как небольшие (20–100 нм), гетерогенные, высокодинамичные, обогащенные холестерином и сфинголипидами домены,

которые разделяют клеточные процессы и управляются жидкостно-упорядоченным (Lo) (гель)/ жидко-неупорядоченным (Ld) (жидкий кристалл) распределением фаз. Рафты богаты холестерином, являются высокоупорядоченными липидными «островками» и функционируют как организующие центры для встроенных в мембрану белков. Так как липидный бислой является матриксом для мембранно-связанных ферментов, активность этих ферментов во многом регулируется вязкостью липидной фазы мембран, составом липидов. Модуляция вязкости мембранных рафтов имеет решающее значение для функционирования клетки. Например, изменение микровязкости мембранных рафтов может изменять распределение и функцию мембраносвязанных рецепторов, ферментов и других белков, диффундирующих латерально вдоль поверхности клетки [27-28]. Помимо структурной роли, липиды также обеспечивают правильное микроокружение для прикрепления мембранных белков [29].

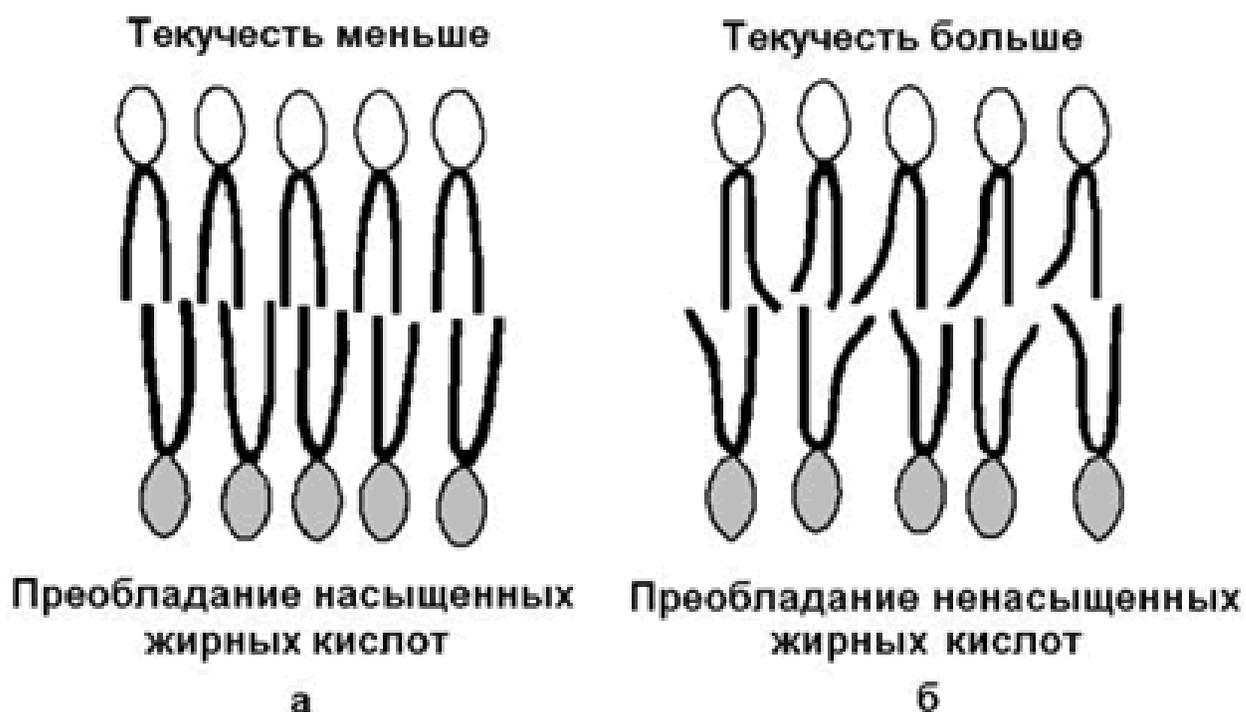


Рисунок 4. Репрезентативное изображение изменения микровязкости мембран клеток в зависимости от насыщенности жирных кислот.

От скорости синтеза ДНК в клетке напрямую зависит интенсивность обновления фосфолипидов. Несколько исследований указывают на связь интенсивности синтеза ДНК с составом липидов, их перераспределением в мембране клетки, степенью ненасыщенности жирнокислотных радикалов (например, насыщенные жирные кислоты тормозят синтез ДНК). Установлено, что микровязкость мембран отличается в разных фазах клеточного цикла: максимальная вязкость достигается в митозе (3.5 пуаз), минимальная в S-фазе (1.9 пуаз) [30].

Сложное взаимодействие между всеми этими факторами позволяет живым клеткам поддерживать вязкость мембран в узких пределах, специфичных для каждого типа клеток, что является ключевым моментом клеточного гомеостаза и выживаемости, а дезорганизация липидов в мембране может значительно нарушать клеточную передачу сигналов [31].

1.2 Особенности вязкости опухолевых клеток

Известно, что многие биофизические и биохимические свойства мембраны, в том числе её микровязкость, во многом обусловлена именно качественным и количественным липидным составом мембраны. Особый интерес представляет липидный состав в опухолевых клетках, т.к. известно, что состав и количество жирных кислот, фосфолипидов и содержание холестерина различаются в разных типах клеток, в частности нормальных и опухолевых [5-6]. Поэтому важную задачу представляет собой исследование взаимосвязи между нарушением вязкостных характеристик мембран и развитием онкологических заболеваний. Однако эта проблема на сегодня мало изучена.

Попытки измерения вязкости опухолевых клеток предпринимались ещё в прошлом столетии с использованием традиционных механических методов. Так, в работах М. Гаера использовался метод центрифугирования гомогенатов клеток опухолевых и нормальных тканей. Было установлено, что вязкость опухолевых

клеток выше, чем нормальных, что предположительно связано с накоплением молочной кислоты в них [5-6].

Известно, что микровязкость цитоплазмы опухолевых клеток оказалась ниже, чем у нормальных клеток [7], а микровязкость мембран варьирует в разных клеточных линиях [32]. Разница в значениях вязкости у опухолевых и нормальных клеток также подтвердилась с применением метода атомно-силовой микроскопии в культуре [33]. Кроме того, были выявлены отличия в вязкости клеток доброкачественных и злокачественных опухолей. С помощью метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), авторами работы было установлено, что вязкость клеток доброкачественных опухолей составляет 0.99 кПа, а клеток злокачественных опухолей 1.97 кПа [34]. С использованием атомно-силовой микроскопии в модели прогрессивного рака яичников было показано, что клетки яичников мышей более вязкие в ранней стадии развития рака [35].

С другой стороны, известно, что мембраны опухолевых клеток обладают более высокой текучестью, чем мембраны неопухолевых клеток [36-37]. Текучесть плазматической мембраны значительно коррелирует со злокачественным потенциалом этих клеток. Имеются данные о том, что снижение вязкости плазматической мембраны раковых клеток тесно коррелирует со способностью раковых клеток образовывать метастазы [38-39]. Изменения вязкости плазматической мембраны опухолевых клеток могут влиять на антигены и рецепторы [40-41], а также на подвижность и способность раковых клеток проникать в базальную мембрану [42] и потенциал метастазирования [39]. Так, в исследованиях методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) резецированных тканей легкого было показано, что в опухолевой ткани присутствовало больше жидких мембран и мембранных доменов, чем в нормальных тканях легких [36]. Это наблюдение согласуется с работами на культурах опухолевых клеток, которые обычно показывают более высокую текучесть мембран, чем их нормальные аналоги [42-44]. Некоторые опухолевые клетки, включая лимфомы и карциномы легких [37,

45-46], обладают более высокой текучестью мембран, чем их нормальные аналоги. Напротив, другие раковые клетки, такие как линия опухолевых клеток гепатомы, имеют пониженную текучесть мембран в результате более низкой степени ненасыщенности жирных кислот и повышенного содержания холестерина [47].

Так как липидный профиль во многом обуславливает вязкость мембраны, есть много работ, в которых показано, что липидный состав раковых клеток отличается от профиля нормальных клеток, но он также варьируется между типами злокачественных новообразований [48-50]. К сожалению, не существует специфического липидного профиля, характерного для раковых клеток, который бы отличал их от доброкачественных клеток [51]. Более того, липидный состав раковых клеток может колебаться во времени в зависимости от их физиологического состояния. Например, клетки, готовящиеся к метастазированию, снижают содержание холестерина в мембранах, чтобы увеличить текучесть и пластичность мембран, что важно для проникновения в кровеносные сосуды [52]. Исследования молекулярной динамики показали, что потеря липидной асимметрии, наблюдаемая в раковых клетках, приводит к снижению проницаемости мембраны [53].

В широком спектре видов рака наблюдаются изменения метаболизма липидов мембраны, в частности фосфатидилхолина [54]. Увеличение количества фосфатидилхолина снижает вязкость клеток и повышает пролиферативную активность раковых клеток [55-57]. Сфингомиелин в свою очередь увеличивает микровязкость мембраны, это ведёт к повышению устойчивости к химиотерапии [58-59]. Кроме того, повышенный уровень сфингомиелина действует как фактор, способствующий развитию опухоли [60]. Такая активность возникает из-за снижения проапоптотического церамида, который образуется при распаде сфингомиелина [60].

Кроме того, в раковых клетках нарушается синтез холестерина. Количество холестерина в мембранах раковых клеток напрямую зависит от их метастатической активности. Так, например, неподвижные клетки рака молочной железы

демонстрируют повышенный уровень холестерина [62]. И наоборот, подвижным клеткам Т-лимфобластной лейкемии требуется более низкий уровень холестерина в мембранах для увеличения гибкости их плазматической мембраны и, таким образом, для улучшения способности проникать в различные ткани. Содержание холестерина играет ключевую роль в регуляции вязкости мембран, которая в свою очередь влияет на устойчивость к химиотерапии и метастатические свойства раковых клеток. Раковые клетки, готовящиеся к метастазированию, как правило, демонстрируют более низкий уровень холестерина в мембранах, чтобы максимизировать текучесть мембран [63-64]. Эта особенность позволяет неопластической клетке легко изменять свою форму. И наоборот, более высокий уровень холестерина в мембранах является причиной устойчивости к химиотерапии [64].

Было доказано, что клетки с более высокой концентрацией холестерина в мембранах имеют тенденцию проявлять большую лекарственную устойчивость по сравнению с клетками с более низким содержанием холестерина [65-66]. Это может происходить из-за герметизации плазматической мембраны за счет уменьшения пустых пространств в липидном бислое. Также показано, что высокое содержание холестерина напрямую связано с увеличением количества липидных рафтов [67-68], домены которых участвуют в клеточной пролиферации, дифференцировке, апоптозе и миграции и, соответственно, вовлечены в злокачественную трансформацию, неконтролируемый рост, инвазивность и метастазирование [69]. Повышенная вязкость мембран создает обилие белков интегринов, адгезинов, рецепторов CD44 и CD24, которые участвуют в прогрессии опухоли и ее инвазии и локализуются в липидных рафтах [70-71].

Интересно, что плазматическая мембрана раковых клеток демонстрирует иную степень ненасыщенности, чем в незлокачественных клетках [72-75]. Чтобы защитить плазматическую мембрану от перекисного окисления липидов, раковые клетки поддерживают более низкую степень ненасыщенности жирных кислот, входящих в её состав [75-76].

Таким образом, изменения микровязкости мембран опухолевых клеток могут способствовать их адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды и дальнейшей миграции.

1.3 Роль микровязкости мембран опухолевых клеток в ответе на химиотерапию

Несмотря на фундаментальное значение микровязкости мембран для клеточной биологии и физиологии, ее роль в патогенезе рака и реакции на терапию до конца не изучена. Химиотерапия остается одним из основных видов лечения рака. Однако физиологические процессы, происходящие при действии химиотерапевтического агента на живую клетку, полностью не описаны. Растущее число исследований показывает, что реакция раковых клеток на препарат в значительной степени зависит от биофизических свойств плазматической мембраны.

Структурные, биофизические и функциональные особенности клеточных мембран раковых клеток могут в значительной степени ингибировать активность и снижать токсичность лекарств [77]. В то же время сами химиотерапевтические препараты могут изменять микровязкость плазматической мембраны, даже если мембрана не первичная мишень для действия лекарства, например, через прямое взаимодействие с липидным бислоем или опосредованно, например, через перекисное окисление липидов. Есть данные о том, что липиды могут использоваться в качестве мишеней для преодоления устойчивости к противоопухолевым препаратам [67]. Кроме того, характеристики мембраны, в частности её вязкость, также влияют на проникновение, конформацию и расположение лекарственного препарата внутри мембраны а, следовательно, контролируют их влияние на терапевтическую мишень [77]. Однако взаимосвязь между вязкостью мембраны и ответом опухолевой клетки на проводимую химиотерапию пока плохо охарактеризована.

Цисплатин и другие химиотерапевтические препараты на основе платины являются наиболее широко используемыми лекарствами в современной онкологии, которые назначают примерно 50% онкологических больных. Соединения платины связываются с пуриновыми основаниями ДНК и образуют внутри- и межцепочечные перекрестные связи, что приводит к ограничению репликации ДНК, транскрипции, остановке клеточного цикла и апоптозу. Хотя ДНК является основной мишенью для комплексов платины, были описаны множественные нецелевые эффекты, включая изменения плазматической мембраны [8].

В настоящее время признано, что состав и текучесть плазматической мембраны влияют на чувствительность клеток к цисплатину, тогда как влияние цисплатина на биологические мембраны изучено очень плохо. Хотя значительные исследования были посвящены взаимодействию цисплатина с липидными бислоями на уровне модельных мембран, гораздо меньше внимания уделялось индуцированным цисплатином изменениям биофизических свойств мембран раковых клеток. Lacombe и др. и Rebillard и др. сообщили о быстром временном увеличении текучести плазматической мембраны в клетках колоректального рака, подвергшихся лечению цисплатином, что было связано с инициацией апоптоза [8, 78].

Известно, что цисплатин взаимодействует с мембранными фосфолипидами при его проникновении внутрь клетки (рис. 5). Связывание цисплатина с анионными фосфолипидами может способствовать снижению поглощения химиотерапевтического агента раковыми клетками и, следовательно, развитию лекарственной устойчивости. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии было показано, что цисплатин вызывает увеличение температуры плавления модельных мембран, состоящих из отрицательно заряженных фосфолипидов, и, как следствие, повышение микровязкости мембран [79]. Эффект придания жесткости, вызываемый противоопухолевым препаратом, можно объяснить взаимодействием положительно заряженного цисплатина с отрицательно

заряженным фосфотидилхолином, которое приводит к нейтрализации зарядов, подтверждая, что электростатические взаимодействия участвуют в связывании цисплатина с фосфолипидом.

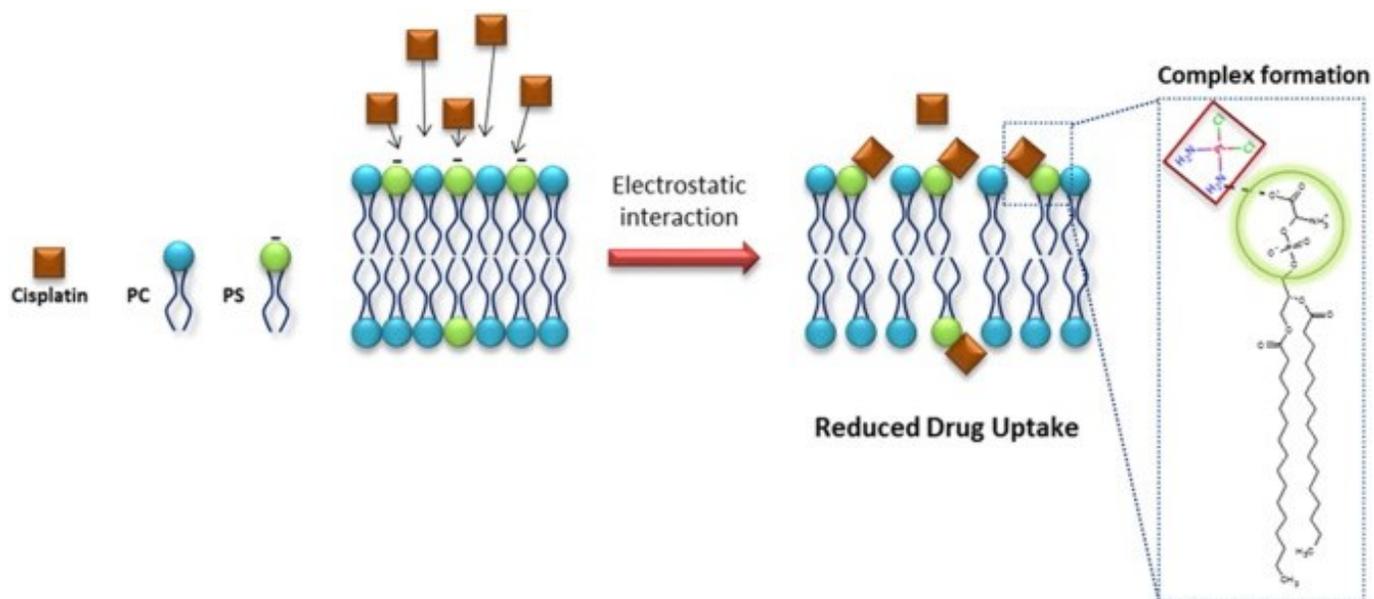


Рисунок 5. Схематическое изображение взаимодействия цисплатина с фосфатидилхолином и фосфатидилсерином на гипотетической мембране. Цисплатин образует стабильный комплекс с фосфатидилхолином из-за электростатических сил между противоопухолевым препаратом и головной группой фосфолипида [89].

Однако исследования флуоресцентной спектроскопией показали, что, несмотря на конформационные изменения, вызванные цисплатином на липидном бислое, не наблюдалось значительных изменений микровязкости мембраны. Эти исследования были выполнены в модельных мембранах DMPC [80], а эффекты цисплатина и его аналогов на текучесть этих или других модельных мембран могут быть разными. Действительно, в липосомных смесях DOPS с помощью атомно-силовой микроскопии было обнаружено, что включение цисплатина в мембрану приводит к более жестким мембранам по сравнению с везикулами без цисплатина [81]. Более того, измерения ЯМР спектроскопии на ядрах ^{31}P бислоев, образованных из липидных экстрактов, показали, что цисплатин вызывает изменения в фазовом

поведении мембран [82]. Однако эти изменения не наблюдались в модели LUV, состоящей из смеси фосфатидилхолин/холестерин/PEG [83], что свидетельствует о специфичности липидного состава мембран для цисплатин опосредованных эффектов. Более того, исследования флуоресцентного фотообесцвечивания асцитных раковых клеток показали, что латеральная диффузия фосфолипидов также была ниже после обработки платина-содержащим препаратом [84], что согласуется с индуцированным цисплатином снижением текучести мембран.

Поскольку цисплатин может вызывать изменения микровязкости мембраны, не исключено, что этот препарат может модулировать сигнальные события при его взаимодействии с мембраной. Изменения микровязкости мембран могут изменить функциональные свойства раковой клетки и вызывают апоптоз [85]. Несколько исследований с использованием разных линий раковых клеток продемонстрировали, что цисплатин индуцирует апоптоз посредством транслокации и/или активации рецептора Fas в липидных рафтах [78]. Фактически, соответствующая терапевтическая концентрация цисплатина, как было показано, вызывает временное снижение вязкости мембран клеток HT29, которое сохраняется в течение 4 часов, как измерено с помощью метода ЭПР [78]. Эти изменения микровязкости мембран сопровождались образованием крупных агрегатов CD95 и их дальнейшим перераспределением с образующими Fas-ассоциированными белками с доменом смерти FasL и прокаспазой-8 в липидные рафты. Другие исследования, также использующие преимущества метода ЭПР, показали, что индуцированная цисплатином разжижение мембран участвует в активации пути рецептора смерти Fas, что, в свою очередь, приводит к быстрой и временной реорганизации микрофиламентов F-actin [86].

В целом эти исследования предполагают, что индуцированные платина-содержащими препаратами изменения биофизических свойств мембран и структуры цитоскелета могут лежать в основе кластеризации рецепторов смерти и активации апоптотических каскадов. Эти события происходят до образования аддукта платина-

ДНК и, вероятно, являются ранними этапами, способствующими цитотоксичности цисплатина.

Последние работы в области биофизики мембран указывают на новое перспективное направление в лечении онкологических заболеваний - мембранно-липидную терапию, в которой мембрана играет важную роль в качестве мишени для новых лекарств, которые способны модулировать липидный состав и/или структуру мембраны. Кроме того, синергетический эффект может быть получен за счет использования лекарств, способных изменять микровязкость мембран, и обычных цитотоксических лекарств, используемых в химиотерапии. Очевидно, что для улучшения разработки лекарств необходимо учитывать вклад нескольких важных свойств мембраны раковых клеток в ответ опухоли на терапию, в частности её микровязкость.

Кроме того, устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам представляет собой серьезную и нерешенную проблему, ограничивающую эффективность терапии. Большая часть злокачественных новообразований человека является резистентной к цитотоксическим препаратам на основе платины [87-88]. Даже если опухоль изначально чувствительна к химиотерапии, в процессе лечения у нее может развиться резистентность и быстро наступить рецидив.

Все больше данных свидетельствуют о том, что измененные биофизические и биохимические свойства клеточной мембраны способствуют устойчивости раковых клеток к химиопрепаратам. Сообщается, что опухолевые клетки перестраивают липидный состав и организацию мембраны, чтобы невелировать эффект противоопухолевых препаратов. Наиболее частыми изменениями липидов мембран в устойчивых к лекарствам раковых клетках являются увеличение содержания сфинголипидов и холестерина [89], что делает мембрану более вязкой. Как следствие, замедляется проникновение лекарства в клетки путем пассивной диффузии. Кроме того, эти изменения влияют на активность

мембранных транспортеров и каналов, которые контролируют поглощение и отток лекарств и инактивируют апоптотическую передачу сигналов [89].

Исследования с использованием атомно-силовой микроскопии показывают, что линии клеток рака яичников, устойчивые к цисплатину, обладают значительно более высокой жесткостью по сравнению с их аналогами, чувствительными к цисплатину [90-91], что может говорить о повышенной микровязкости мембран этих клеток. Более того, увеличение жесткости чувствительных клеток наблюдалось после воздействия цисплатином, тогда как для резистентных клеток изменений не наблюдалось [91].

Взаимосвязь между вязкостью мембран и химиорезистентностью опухолевых клеток также изучал X. Liang с соавт. Исследования, проведенные с клеточной линией аденокарциномы легкого человека A549, устойчивой к цисплатину (A549/DDP), показали, что эти клетки имеют более вязкую мембрану по сравнению с клетками A549, чувствительными к цисплатину (рис. 6) [92-93]. Липидомный анализ этих клеток показал, что клетки A549/DDP содержат более высокий процент насыщенных жирных кислот, чем клетки A549 [92], с более высоким уровнем жирных кислот C16:0 и уменьшением уровня жирных кислот C18:0 [93]. Наблюдаемые различия в микровязкости мембран между этими двумя клеточными линиями можно объяснить различным составом и свойствами жирных кислот, присутствующих в этих клетках, где обогащение липидами насыщенными ацильными цепями вызывает повышение вязкости и снижение латеральной диффузии мембраны [94]. Кроме того, измерения флуоресценции поляризации TMA-DRH показали, что изменение проникновения лекарственного препарата было связано с увеличением вязкости плазматической мембраны [95].

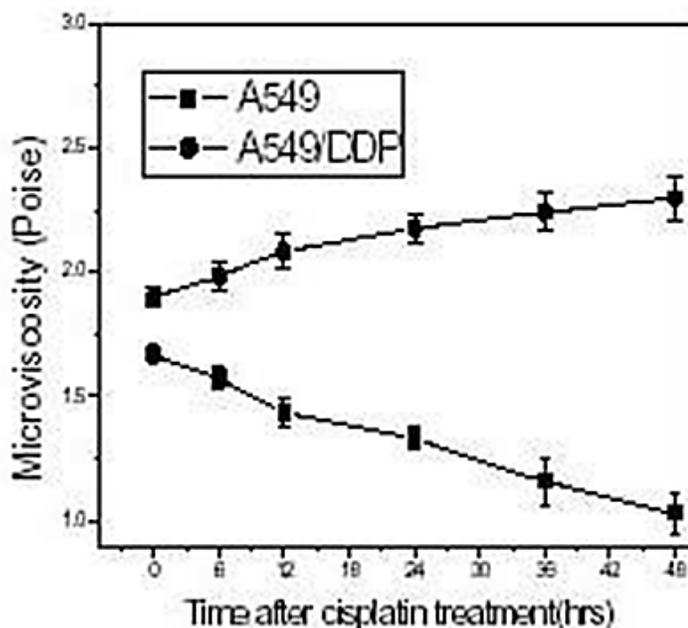


Рисунок 6. Микровязкость плазматических мембран клеток A549 и A549/DDP, инкубированных с клинической дозой цисплатина 30 мкм [92].

Клетки рака молочной железы MCF-7/S, устойчивые к цисплатину, также имеют другой липидный профиль по сравнению с клетками MCF-7/CP с повышенным содержанием холестерина, сфингомиелина, и пониженным уровнем фосфотидилхолина [96]. Увеличение холестерина и сфингомиелина с уменьшением соотношения фосфотидилхолин/сфингомиелин убедительно указывает на увеличение микровязкости мембран резистентных клеток, как это наблюдается для клеток A549/DDP [96]. Также было обнаружено, что микровязкость плазматической мембраны клеток с множественной лекарственной устойчивостью более гетерогенна по сравнению с нерезистентными опухолевыми клетками [97].

При описании действия цисплатина было показано, что цитотоксический механизм цисплатина включает активацию aSMase [8, 78, 86, 98]. Однако активация этого пути также зависит от чувствительности клеток к цисплатину [98]. Хотя путь aSMase активируется в клеточной линии карциномы яичников A2780, этого не наблюдается для устойчивого к цисплатину аналога клеточной линии A2780/C30

[98]. Эти результаты свидетельствуют о важности активации aSMase и последующих изменений биофизических свойств плазматической мембраны в механизме, лежащем в основе индуцированной цисплатином гибели клеток.

Наблюдаемые различия в биофизических свойствах мембраны цисплатин-резистентных клеток могут быть прямой причиной устойчивости из-за изменений в структуре мембраны и, как следствие, нарушения кластеризации рецепторов и внутриклеточной передачи сигналов, что может привести к снижению апоптотического ответа на цисплатин в резистентных клетках. Пассивная диффузия и внутриклеточное накопление цисплатина также может быть снижено за счет увеличения упаковки липидной мембраны, что ограничивает цитотоксический эффект платина-содержащих препаратов.

В целом, представленные здесь данные свидетельствуют о том, что липидный состав и микровязкость мембран являются двумя взаимосвязанными факторами, которые вовлечены в процессы индуцирования гибели клеток и/или развития механизмов устойчивости к химиопрепаратам платинового ряда.

1.4 Методы измерения вязкости

На сегодняшний день разработано множество методов измерения вязкости (Kuimova, 2012):

- Механические:
 - Конические, пластинчатые и капиллярные вискозиметры
 - Реометрия
- Спиновые зонды (Рамановская спектроскопия)
- Оптические (флуоресцентные):
 - Анизотропия флуоресценции
 - Восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP - Fluorescence recovery after photobleaching)
 - Флуоресцентные молекулярные роторы

Механические методы основаны на законах Пуазейля, Стокса, течения жидкости между соосными цилиндрами и др. К механическим методам измерения вязкости относятся методы вискозиметрии, центрифугирования, реометрии, дилатометрии [15, 99]. Их применение, как правило, ограничено измерениями вязкости в жидком образце большого объема и процедура измерения занимает длительное время. Также важно понимать, что микровязкость многих материалов не является однородной: она может сильно отличаться на микроскопическом масштабе [9]. Тем не менее, разными механическими способами оценивалась, например, вязкость протоплазмы: с помощью капиллярного и ротационного вискозиметра; по измерению скорости движения магнитных микрочастиц; путем смещения под воздействием центробежной силы каких-либо включений клетки, методом центрифугирования и др.

Метод рамановской спектроскопии с помощью спиновых зондов основан на неупругом рассеянии монохроматического света исследуемыми молекулами [100]. Метод спиновых зондов был использован для оценки микровязкости мембран изолированных эндотелиальных клеток сосудов. С помощью спектров ЭПР было определено время корреляции вращательной диффузии спиновых меток в мембранах, которое пропорционально значению микровязкости липидного слоя. В результате исследования было обнаружено, что мембраны клеток артерии обладают наибольшей микровязкостью по сравнению с клетками венозных сосудов, при этом разница в микровязкости достигает трехкратного значения [100-101].

На сегодняшний день применение оптических методов для измерения микровязкости мембран клеток является наиболее перспективным, так как они мало- или неинвазивны, что позволяет проводить исследования в живых клетках и тканях [102].

Двумя наиболее распространенными оптическими методами измерения микровязкости являются флуоресцентная анизотропия [103-104] и восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP) [105-106].

Флуоресцентная анизотропия является характеристикой степени поляризации образца и выражается как разница параллельной и перпендикулярной составляющих флуоресценции в пересчете на общую интенсивность флуоресценции. Типичные анизотропные флуорофоры (например, DPH) возбуждаются и путем вращательной диффузии изменяют плоскость поляризации. Таким образом, величину флуоресцентной анизотропии определяет скорость вращательной диффузии флуорофора. во время жизни его возбужденного состояния [103-104, 107]. На рисунке 7 продемонстрирована зависимость коэффициента анизотропии флуорофора DPH от процента содержания этанола в растворе.

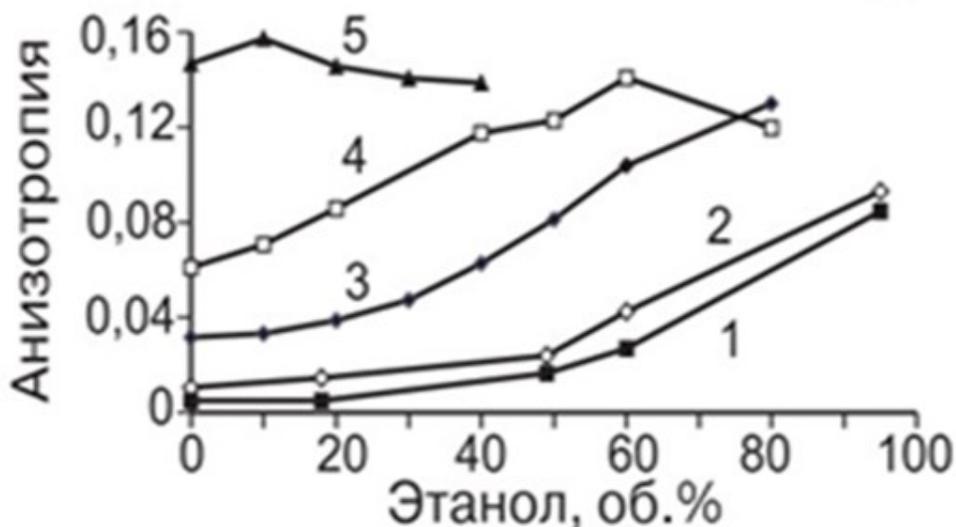


Рисунок 7. Зависимость скорости вращательной диффузии флуорофора DPH в растворах с разным содержанием этанола [103].

FRAP основан на диффузии флуорофора в двумерном слое (например, клеточной мембране). Когда лазерный импульс выжигает молекулы флуорофора в небольшой области клетки, молекулы из необлученной зоны диффундируют в облученную, и флуоресценция восстанавливается. Тушение флуоресценции зонда высокоинтенсивным лазерным излучением, называется обесцвечивание, отсюда и термин — фотообесцвечивание. По скорости этого процесса судят о подвижностях молекул [105-106].

1.4.1 Флуоресцентные молекулярные роторы

Благодаря развитию флуоресцентных методов и появлению флуоресцентных молекулярных роторов стало возможным измерение локальной вязкости в клетках в реальном времени [3, 32, 99]. Принцип использования флуоресцентных молекулярных роторов для исследования микровязкости заключается в анализе изменения интенсивности и/или времени жизни флуоресценции в зависимости от вязкости окружающей их среды [12]. Измерение локальной вязкости, в том числе, и внутриклеточной стало возможным благодаря тому, что высокую вязкостную чувствительность флуоресцентных параметров роторов можно оценить количественно с помощью простых математических уравнений [13].

Флуоресцентные молекулярные роторы — группа флуоресцентных молекул, возбуждение светом которых приводит к внутримолекулярному движению отдельных фрагментов молекулы (вращению или скручиванию). При возникновении внутримолекулярного скручивания молекулярный ротор возвращается в основное состояние либо с испусканием фотона, спектр которого смещен в более красную полосу излучения, либо за счет безызлучательной релаксации [108].

Как и все флуорофоры, молекулярный ротор переходит из основного состояния (S_0) в энергетически более высокое первое возбужденное состояние (S_1) за счет поглощения фотонов. Однако для молекулярных роторов схема Яблонского должна быть расширена, поскольку энергия возбужденного состояния в «скрученном» состоянии с внутримолекулярным переносом заряда ПИСТ (*Twisted Intramolecular Charge Transfer*) меньше, в то время как энергия основного состояния выше [109]. Таким образом, S_1 — S_0 энергетическая щель ниже в состоянии ПИСТ с, соответственно, более низкой энергией релаксации [108]. ПИСТ гипотеза была

впервые сформулирована Грабовским в 1973 году [110]. Расширенная диаграмма Яблонского с ТІСТ состоянием представлена на рисунок 8.

В случае молекулярных роторов с двухдиапазонным излучением (например, DMABN), энергетическая щель ТІСТ немного меньше, чем энергетическая щель в обычных условиях (рис. 8). Если энергетическая щель ТІСТ намного меньше, чем энергетическая щель в обычных условиях, например, в DCVJ, переход в состоянии ТІСТ происходит без излучения фотонов (рис. 8) [108].

Принцип измерения вязкости с помощью флуоресцентных молекулярных роторов заключается в сильной зависимости параметров их флуоресценции (интенсивность и время жизни флуоресценции, спектры) от вязкости микроокружения [9, 13, 17, 111-112].

В средах с низкими значениями вязкости облегчается безызлучательный переход энергии возбужденного состояния посредством внутримолекулярного движения. И, наоборот, внутримолекулярное движение затруднено в средах с высокими значениями вязкости, что приводит к увеличению вероятности перехода энергии с высвечиванием кванта света, и, соответственно, к изменению параметров флуоресценции, таких как интенсивность и время жизни [113].

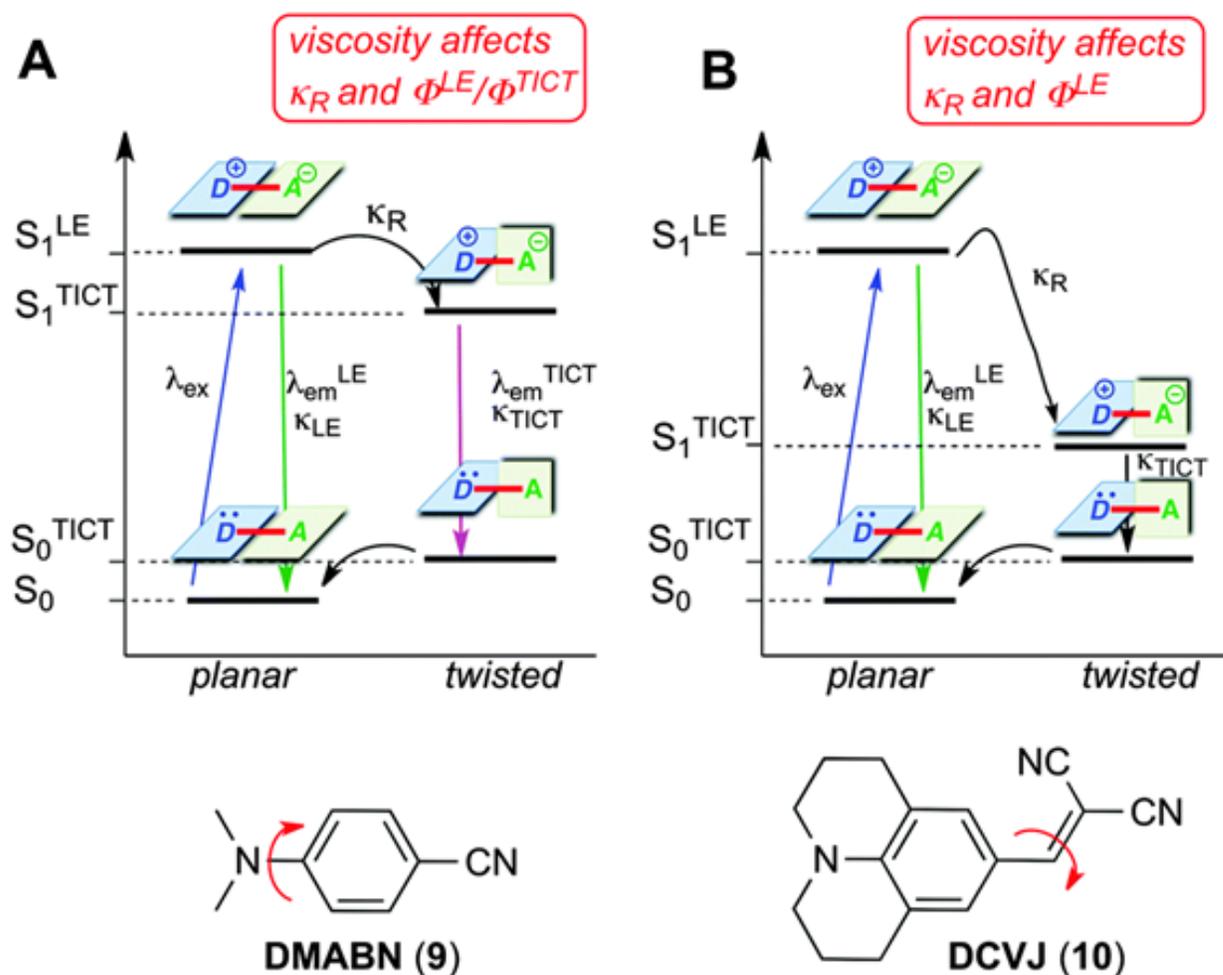


Рисунок 8. Расширенная диаграмма Яблонского с TICT состоянием на примере молекулярного ротора DMABN (A) и DCVJ (10) (B) [108].

Зависимость флуоресцентных параметров молекулярного ротора от значения вязкости микроокружения описывается с помощью простых математических уравнений, полученных теоретически и подтвержденных экспериментально. Так, уравнение Фёрстера-Хоффмана связывает квантовый выход флуоресценции с вязкостью растворителя [17]:

$$\phi = z\eta^\alpha,$$

где ϕ - квантовый выход, η - вязкость, z и α - константы.

Основная проблема подхода к измерению вязкости с использованием квантового выхода ротора — влияние не только вязкости, но и других факторов

(например, локальной концентрации красителя и/или интенсивности возбуждающего света) на интенсивность флуоресценции. Поэтому более перспективным подходом считается анализ вязкости по времени жизни флуоресценции [17]:

$$\lg \tau = \lg(z/k_r) + \alpha \lg \eta,$$

где τ - время жизни флуоресценции, k_r - константа скорости излучательного перехода, η - вязкость, z и α - константы.

Таким образом, применив данное уравнение можно получить калибровочную кривую зависимости времени жизни флуоресценции ротора от значений вязкости. Типичная калибровочная кривая продемонстрирована на рисунке 9. Используя данный калибровочный график можно получить абсолютные значения вязкости.

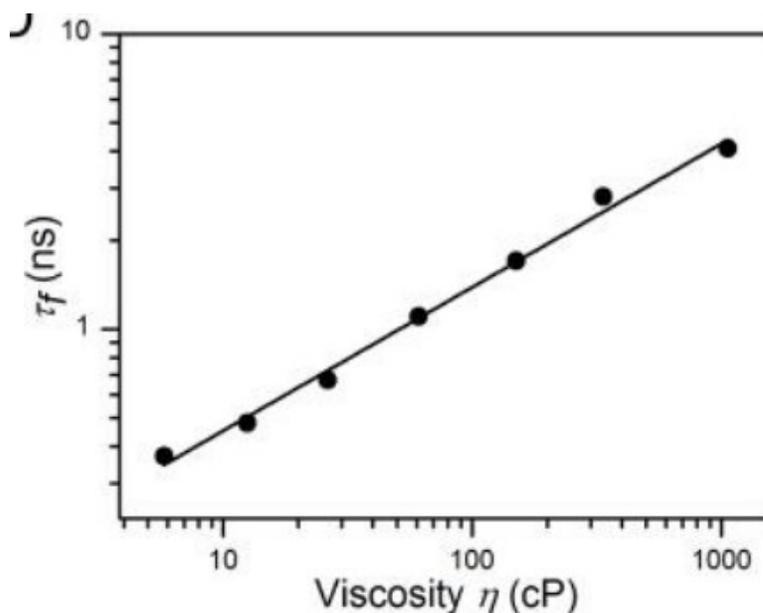


Рисунок 9. Графическое выражение зависимости между временем жизни флуоресценции и вязкостью [111].

В отличие от интенсивности, время жизни флуоресценции в разумных пределах не зависит от концентрации флуорофора. Это верно, когда соблюдаются следующие два условия: отсутствие излучательных процессов агрегатного состояния, и отсутствие самотушения в возбужденном состоянии. Эти явления, как

правило, приводят к немонотонному затуханию флуоресценции и затрудняют оценку вязкости [17].

На сегодняшний день известно много флуоресцентных молекулярных роторов, которые нашли широкое применение для визуализации клеточных органелл [12-14], включая специфические зонды для лизосом [72] и митохондрий [114], а также ДНК зонды [115]. Однако специально разработанные мембрано-специфичные молекулярные роторы успешно использовались для зондирования вязкости лишь в липидных бислоях [12, 15] и монослоях клеток [16-17]. Визуализация плазматической мембраны в живых клетках сложна из-за крайне эффективного эндоцитоза красителей.

Одним из типичных представителей молекулярных роторов является 1,4-диметиламинобензонитрил (DMABN) (рис. 10). Длина волны пика возбуждения DMABN сильно смещена в синюю область и его диапазон излучения составляет от 340 до 460 нм. Этот диапазон длин волн непригоден для использования в биологических системах. Еще более важно, что полярность играет большую роль в дезактивации возбужденного состояния DMABN и ее влияние не может быть однозначно отделено от вязкости [116].

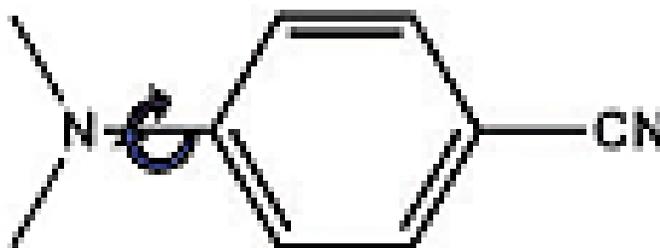


Рисунок 10. Структура DMABN [116].

Другим примером флуоресцентных молекулярных роторов является DPH (1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен), структура представлена на рисунке 11. С его помощью методом поляризации была измерена в работе М. Petitou микровязкость мембран

нормальных лимфоцитов и лимфоцитов больных лейкемией. Наблюдалось снижение микровязкости в мембранах у последних [117].

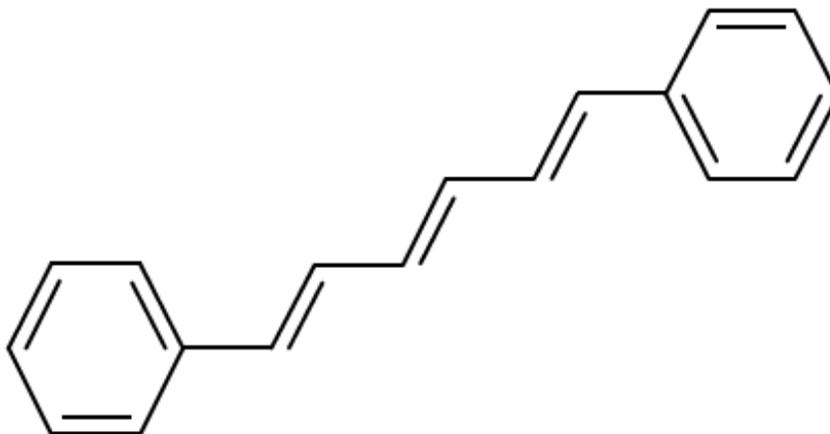


Рисунок 11. Структура DPH [117].

Тиофлавин Т и его производные (2-(4'-(диметиламино) фенил)-6-метилбензотиазол (БТА-2)) также могут использоваться как флуоресцентные молекулярные ротаторы (рис. 12). Тиофлавин Т является специфическим красителем для амилоидов - нерастворимых нитевидных белковых агрегатов, образование и отложение которых тесно связаны с некоторыми заболеваниями (например, болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона, поздним диабетом и др.) Авторами работы V. Stsiapura и A. Maskevich были произведены эксперименты на водно-глицериновых смесях и установлено, что квантовый выход этого флуорофора повышается с введением его в более вязкую среду благодаря уменьшению торсионной релаксации в молекуле [118].

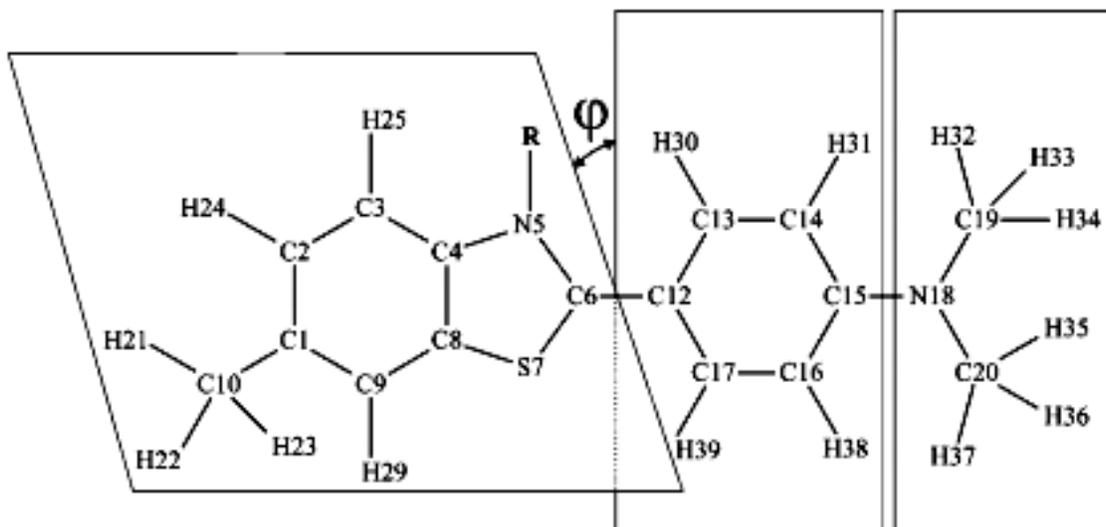


Рисунок 12. Структура Тиофлавина Т [118].

L–L. Zhu в своей работе на водно-глицериновых смесях показал роторные свойства у соединения RCD (моно-(6-О-п-толуолсульфонил)-циклодекстрин)). Чувствительность к вязкости у этого молекулярного ротора может быть как заблокирована, так и активирована (рис. 13). Первый вариант используется для оценки концентрации соединения, а второй, непосредственно, отвечает за вязкость. Было установлено, что с увеличением вязкости возрастает квантовый выход флуоресценции данного флуорофора [119].

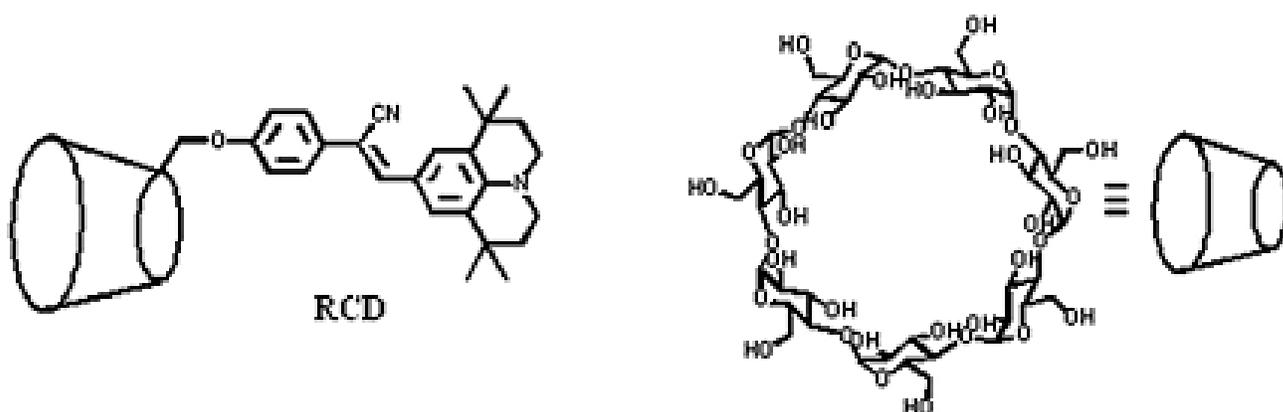


Рисунок 13. Структура RCD [119].

Также к флуоресцентным молекулярным ротаторам относятся юлоидины: FCVJ (2-карбокси-2-циановинил-юлоледин фарнезил эфир), DCVJ (9- (2,2-дициановинил) юлоидин), CCVJ (9 - ([E] -2-карбокси-2-циановинил) юлоидин). М. Nipper использовал FCVJ (рис. 14) в своей работе в модельных мембранах для исследования поведения этого молекулярного ротатора под воздействием различных факторов: спирта, диметилсульфоксида, циклогексана, холестерина. Уменьшение эмиссии FCVJ было обнаружено при обработке спиртом, ДМСО и циклогексаном, в то время как обработка холестерином привела к увеличению эмиссии FCVJ, что согласуется с ожидаемыми изменениями в вязкости мембран [15].

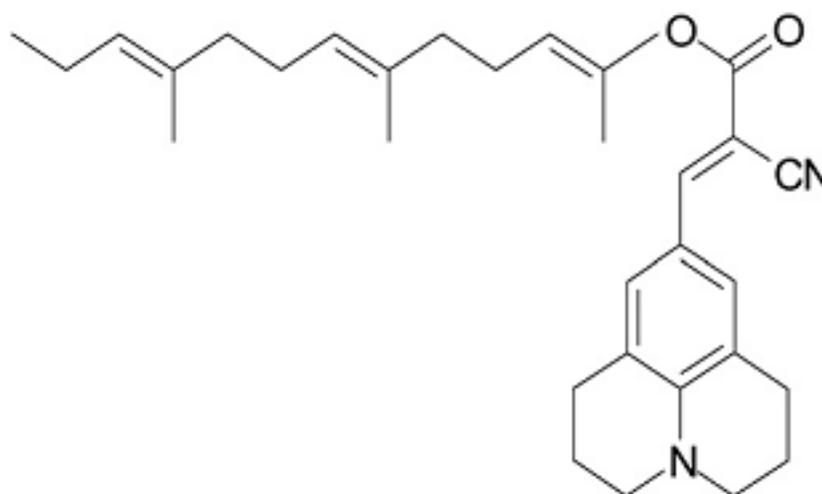


Рисунок 14. Структура FCVJ [15].

Ротаторы DCVJ и CCVJ (рис. 15) использовались для зондирования вязкости в различных системах, в том числе в биологических средах [3]. DCVJ способен встраиваться в клеточную мембрану и может служить для измерения микровязкости мембран. Показано, что DCVJ можно использовать в качестве маркера физиологических изменений в цитоскелете клеток, в который входят тубулин. DCVJ связывается с тубулином, и эта реакция сопровождается увеличением квантового выхода флуоресценции. Было показано, что квантовый выход увеличивается с

увеличением концентрации белка и эта тенденция не меняется при наличии ассоциированных с микротрубочками белков [32, 120].

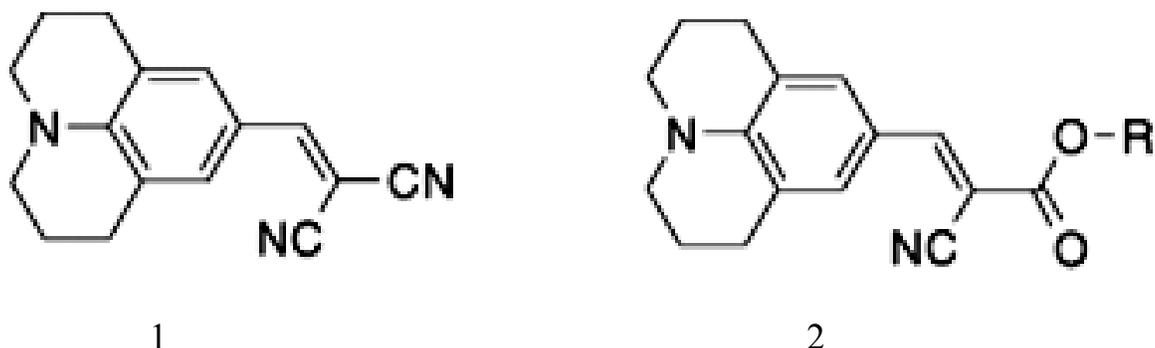


Рисунок 15. Структура молекулярных роторов 1 — DCVJ, 2 — CCVJ [32].

В качестве флуоресцентного молекулярного ротора также используют цианиновый краситель пентамитин RY3 (рис. 16). В работе X. Peng и соавт. сначала на водно-глицериновых смесях, а затем на линиях клеток PC12, MCF-7 и NIH-3T3 показано, что снижение вращения в вязких средах приводит к более сильной флуоресценции (6-кратное увеличение) и удлиняет время жизни флуоресценции (от 200 до 1450 пс) [22].

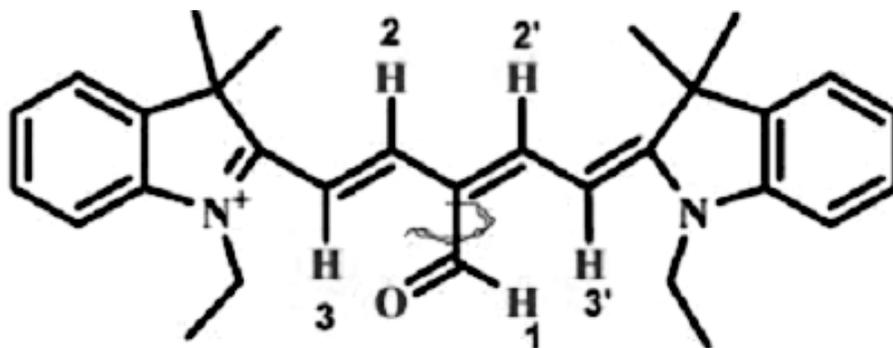


Рисунок 16. Структура RY3 [22].

Среди молекулярных роторов соединения на основе дипиррометена бора BODIPY (рис. 17) обладают наибольшей чувствительностью к вязкости среды и на сегодняшний день наиболее изучены в качестве сенсоров микровязкости эукариотических клеток. В частности, ротор BODIPY2 ранее был охарактеризован

как перспективный зонд для измерения вязкости в модельных мембранах [12, 121], а также в плазматических мембранах живых культивируемых клеток [9, 13, 17, 111]. С помощью ротора BODIPY 1 в 2008 г. группой М. Куимовой была впервые измерена вязкость внутриклеточных мембран живых раковых клеток SK-OV-3 [111]. В 2013 г. той же группой был синтезирован и охарактеризован ротор BODIPY 2, растворимый как в воде, так и в широком спектре органических растворителей [17]. С его помощью была измерена вязкость внутриклеточных органелл и цитоплазматической мембраны клеток SK-OV-3.

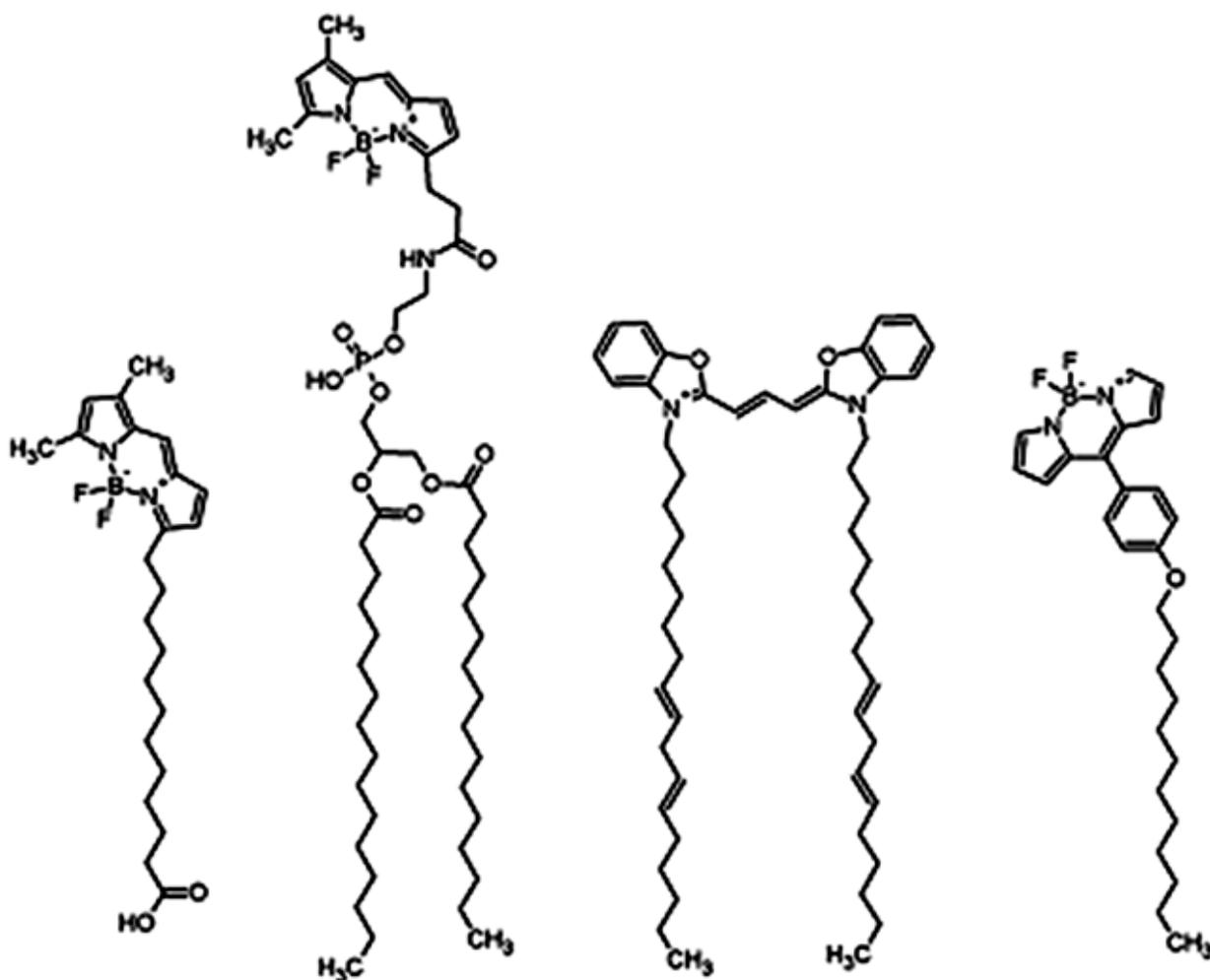


Рисунок 17. Структуры молекулярных роторов на основе BODIPY [12].

Согласно недавним исследованиям, ротор BODIPY подходит для прямых измерений вязкости липидных мембран при переменных температурах (Vyšniauskas

А.,2018, Kuimova M. K. 2018), так как изменение температуры не влияет на фотофизику BODIPY [122-123]. Все ротеры на основе BODIPY характеризуются хорошим клеточным поглощением, а также незначительной токсичностью для культивируемых клеток, что обуславливает перспективность их применения для исследований *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, флуоресцентные молекулярные ротеры — практичный и универсальный инструмент для измерения микровязкости среды, основанный на определении времени жизни флуоресценции. Метод применим в биологических системах, обладает высокой точностью в определении вязкости и позволяет получить карту ее распределения в клетках с высоким пространственным разрешением.

1.4.2 Флуоресцентная время-разрешённая микроскопия FLIM

Флуоресцентная микроскопия предлагает уникальный подход к изучению клеток *in vivo* и *in vitro* благодаря чувствительности, специфичности и универсальности метода. Флуоресценция, испускаемая биологическим образцом, может быть зарегистрирована одновременно и как изображение и как фотометрические данные, и имеет большой потенциал для качественных и количественных исследований функциональных особенностей и структуры клеток. Для визуализации и оценки времени жизни флуоресценции ротеров применяется флуоресцентная микроскопия с функцией временного разрешения FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) [124-125].

Флуоресцентная микроскопия с временным разрешением FLIM является относительно новым подходом во флуоресцентной микроскопии. Этот метод на основе данных о времени жизни флуоресценции позволяет визуализировать и анализировать разные события и процессы, происходящие во внутриклеточных органеллах клетки и компонентах биологического образца.

Первый FLIM инструмент был описан еще в 1959 году и позволял производить точечные измерения времени жизни флуоресценции в образце. Первые двумерные FLIM изображения получили Ван и др. в 1989 году [125-126]. FLIM микроскопия получила дальнейшее развитие независимо в различных группах, но Kusumi с соавторами был в числе первых, кто выполнил визуализацию флуоресценции с временным разрешением в клетке [127].

Первые FLIM изображения тканей человеческого тела были получены 10 лет спустя в 1998 году в Германии Б. Амаечи [126]. Это были изображения зубов и зубных бляшек. Первые данные экспериментов с помощью двухфотонной FLIM микроскопии на мышцах и кожи человека в естественных условиях были получены Мастерсом и др. в 1999 году [126].

В 2000 году был запущен первый клинический многофотонный томограф JenLab GmbH. Кёниг и его коллеги использовали перестраиваемый 80 МГц фемтосекундный титан-сапфировый лазер в качестве источника возбуждения [128].

Время жизни флуоресценции — это среднее время, в течение которого молекула находилась в возбужденном состоянии до того, как вернуться в основное состояние.

Время жизни флуоресценции можно измерить двумя способами:

- 1) С использованием частот — измеряется фазовый сдвиг снижения амплитуды флуоресценции при модуляции возбуждающего света с частотой $\omega \sim 10\text{--}20$ МГц и коэффициентом глубины модуляции m . С помощью прозрачной пластинки модулированный свет делится на два потока. Первый поток (около 8 %) направляется в измерительный канал, а второй большой поток света во втором канале возбуждает флуоресценцию исследуемого образца, также изменяющуюся по синусоидальному закону. Регистрация фотонов происходит с использованием ФЭУ или CCD. Поскольку флуоресценция задерживается в образце на время τ , то колебания флуоресцентного сигнала сдвигаются по фазе на величину $\Delta \varphi$ относительно второго возбуждающего светового потока [125, 128].

2) С использованием времён—сверхкороткие лазерные импульсы приводят флуоресцентный зонд в возбуждённое состояние. После возбуждающего импульса лазера происходит детекция фотонов в каждой временной точке при помощи специальной системы детекции на основе время-коррелированного счета фотонов TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting). Время жизни флуоресценции измеряется из количества зарегистрированных фотонов, время прибытия первого и последующих фотонов после импульса возбуждения измеряется и сохраняется в памяти. Строятся гистограммы времен прихода фотонов, которые представляют собой кривые интенсивности флуоресценции в зависимости от времени [125, 128].

Следует отметить, что оба способа измерения обеспечивают эквивалентную информацию, но на практике выбор способа измерения обусловлен поставленными задачами.

Метод FLIM имеет ряд преимуществ перед обычной флуоресцентной микроскопией, таких, как:

- время жизни флуоресценции не зависит от концентрации флуорофора;
- время жизни флуоресценции не зависит от флуктуаций интенсивности;
- время жизни флуоресценции не зависит от поглощения излучения образцом;
- время жизни флуоресценции не зависит от фотообесцвечивания.

Благодаря этому, метод FLIM обладает высокой специфичностью, большой чувствительностью и разрешением и обеспечивает высокую точность измерений.

Таким образом, флуоресцентные молекулярные ротеры в сочетании с микроскопией FLIM — практичный и универсальный инструмент для измерения микровязкости среды, основанный на определении времени жизни флуоресценции. Метод применим в биологических системах, обладает высокой точностью в определении вязкости и позволяет получить карту ее распределения в клетках с высоким пространственным разрешением.

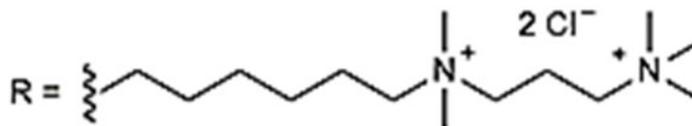
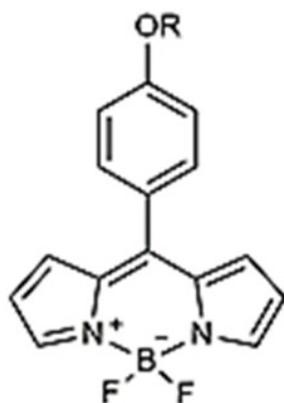
Глава 2. Материалы и методы

2.1 Объекты исследования

Флуоресцентный молекулярный ротор

Флуоресцентный молекулярный ротор BODIPY 2, является производным 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацена (рис. 18). Молекулярный ротор BODIPY 2 был синтезирован группой ученых под руководством Куимовой М. К. (Имперский колледж Лондона, Великобритания).

А



Б

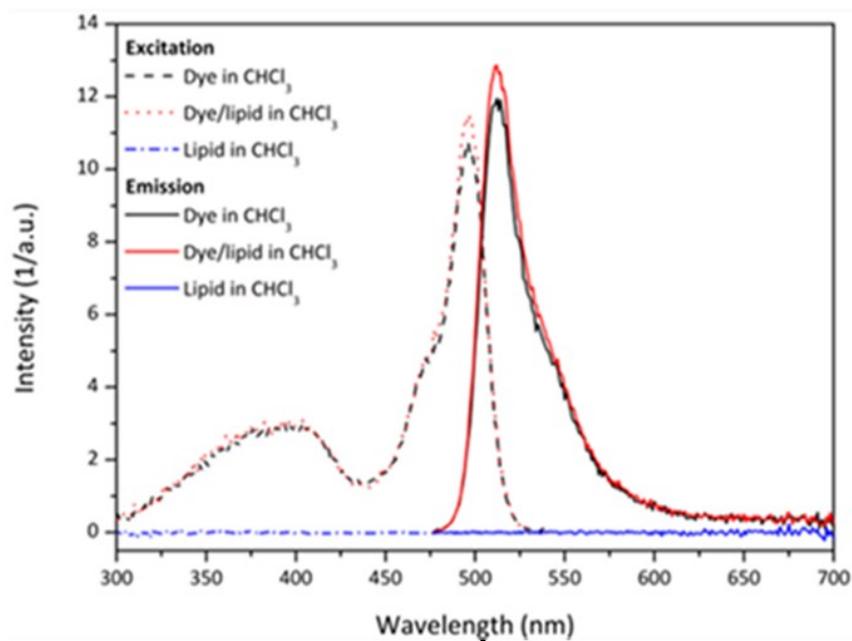


Рисунок 18. Химическая структура флуоресцентного молекулярного ротора

BODIPY 2 (A) и спектр поглощения и эмиссии (Б) [13].

Максимум поглощения составляет 475 нм, максимум испускания – 510 нм. Ротор BODIPY2 в растворе PBS (фосфатно-солевой буфер) с добавлением 1% ДМСО (диметилсульфоксида).

Для перевода значений времени жизни флуоресценции в единицы вязкости (сП) использовался калибровочный график, предоставленный разработчиками сенсора (рис. 19).

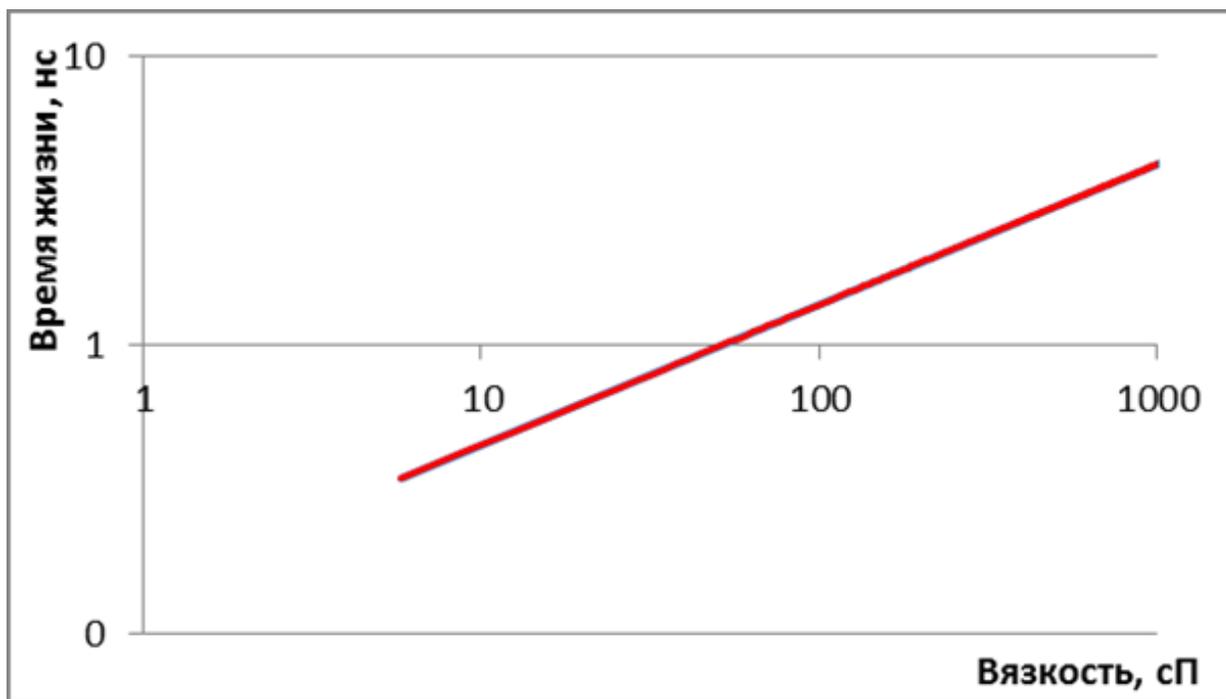


Рисунок 19. Калибровочный график зависимости времени жизни флуоресценции BODIPY 2 от вязкости.

Клеточные культуры

В работе использованы линии аденокарциномы шейки матки человека HeLa Kyoto, колоректального рака мышей CT26, колоректального рака человека HT29 и HCT116, а также резистентный к оксалиплатину аналог HCT116-OXAR.

Лабораторные животные

Экспериментальные исследования были выполнены на самках мышей линий Balb/c и nu/nu, массой 20-22 г. Общее количество животных - 25. Животных приобретали в НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (г. Пущино, Россия) и в SPF виварии Института биологии и биомедицины Университета Лобачевского (г. Нижний Новгород, Россия). Лабораторные мыши содержались в SPF виварии в условиях повышенного контроля с 12-часовым световым режимом и свободном доступе к воде и пище.

Опухолевые модели

Модельные опухоли получали путем подкожной инъекции на правое бедро животным суспензии клеток в соляно-фосфатном буферном растворе (PBS) в количестве 500 тыс опухолевых клеток СТ26 для мышей линии Balb/C; 2,5 млн опухолевых клеток НСТ116 и НСТ116-ОХАР для мышей линии nu/nu. 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.). Все эксперименты, проводимые на животных, осуществлялись согласно протоколам, одобренным Этическим Комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета.

Перед проведением хирургических манипуляций животных наркотизировали путем внутримышечного введения смеси Золетила (50 мкл на животное, 40 мг/кг, Virbac SA, Carros, Франция) и 2% Rometar (10 мкл на животное, 10 мг/кг, Spofa, Чехия). Размер опухоли измеряли штангенциркулем три раза в неделю, и объем рассчитывали по формуле:

$$V = a * b * l / 2 b,$$

где a - длина опухоли, b - ширина опухоли.

Через 23-25 дней после инокуляции опухоли были проведены эксперименты FLIM. Сразу после визуализации вязкости мышей умерщвляли смещением шейных позвонков и вырезали опухоли для гистологических исследований.

2.2 Методы и методики исследования

Культивирование опухолевых клеток

Опухолевые клеточные культуры 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 - FBS (HyClone, США). Клетки пересевали стандартным образом по достижению монослоя (три раза в неделю) с использованием растворов Версена (Панеко, Россия) и трипсина (Панеко, Россия).

Получение трехмерных клеточных культур (опухолевых 3D сфероидов)

Опухолевые сфероиды формировали путем выращивания клеток HeLa Kyoto в условиях 3D культивирования. Трехмерные клеточные культуры формировали в 96-луночных ультранизкоадгезивных планшетах с круглым дном, плотность посева клеток составляла 100 клеток/100 мкл/лунку. Визуализация осуществлялась с 3-го дня после посадки опухолевых клеток, когда сфероиды начинали сформировывать плотные небольшие структуры.

Получение химиорезистентных линий

Оксалиплатин-резистентная линия клеток HCT116-OXAR была создана путем непрерывного воздействия на клетки постепенно увеличивающихся концентраций оксалиплатина. Концентрации оксалиплатина для индукции резистентности составляли 0,1, 0,5, 1,0, 2,0; 8,0 мкМ. В среднем, концентрация увеличивалась

каждые 3 недели после адаптации клеток к оксалиплатину, когда клетки не проявляли никаких морфологических изменений и возобновляли пролиферацию в присутствии указанной концентрации оксалиплатина. Через 20 недель после первого воздействия препарата клетки считали устойчивыми. Исходную клеточную линию НСТ116, культивированную в течение того же количества пассажей, использовали в качестве чувствительного контроля. Микровязкость измеряли на всех концентрациях оксалиплатина, использованных для индукции резистентности.

Протоколы химиотерапии

Протокол лечения цисплатином. Для *in vitro* исследований монослойной клеточной культуры был использован препарат цисплатин (Тева, Израиль) с концентрацией для клеток СТ26 - 2.6 μM (IC50), для HeLa Kyoto – 1.1 (IC50/2), 2.3 (IC50) и 4.3 (2xIC50) μM . Для экспериментов с опухолевыми сфероидами применяли концентрацию препарата 8.6 μM .

Протокол лечения оксалиплатином. Для *in vitro* исследований монослойной клеточной культуры был использован препарат оксалиплатин (Тева, Израиль) с концентрацией для чувствительных (НСТ116) и резистентных (НСТ116-ОХАР) клеток 2.0 μM (IC50). Для *in vivo* экспериментов на мышах линии nu/nu с опухолями НСТ116 и НСТ116-ОХАР был использован оксалиплатин в дозе 7,5 мг/кг массы тела в 100 мкл PBS внутривентрально три раза в неделю, начиная с 10-го дня роста опухоли.

Анализ жизнеспособности клеток in vitro

Для оценки жизнеспособности опухолевых клеток в монослойных клеточных культурах и опухолевых сфероидах проводили окрашивание Пропидиумом иодидом (PI) и Кальцеином (Thermo Fisher Scientific, Великобритания). Визуализацию красителей осуществляли на флуоресцентном микроскопе Leica DMIL (Leica,

Германия). Пропидиум иодидом (PI) были окрашены только мертвые клетки, флуоресценцию красителя детектировали при помощи светофильтра TX2 green (возб: 560/40, рег: 645/75). Кальцеин проникал только в живые клетки, для регистрации сигнала использовали светофильтр YFP ET (возб: 500/20, рег: 535/30).

Анализ концентрации ротора в плазме крови

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 минут при 2500 об/мин для отделения плазмы. Для прокола венозного синуса использовался гематокритный капилляр, предварительно смоченный в гепарине. Однократно забиралось не более 20 мкл крови. Мягким винтовым движением вводили капилляр под глазное яблоко ближе к углу глаза.

После центрифугирования отбирали плазму (10 мкл) дозатором в 10 мм кювету и доводили стерильным физиологическим раствором до объема 3 мл. В качестве контроля использовалась плазма, взятая у контрольных лабораторных животных. Сбор крови у животных производили сразу после инъекции, через 10 мин, 1, 3, 5, 24, 48, 120 часов.

Количественное определение ротора проводили методом спектрофлуориметрии на приборе Shimadzu RF-5301. Измеряли интенсивность флуоресценции в максимуме на 510 нм при возбуждении на 475 нм.

Для количественного определения содержания роторов в плазме был построен калибровочный график зависимости величины интенсивности флуоресценции от концентрации препарата. В диапазоне выбранных концентраций зависимость была линейна (достоверность аппроксимации $R^2 \sim 1$) (рис. 20).

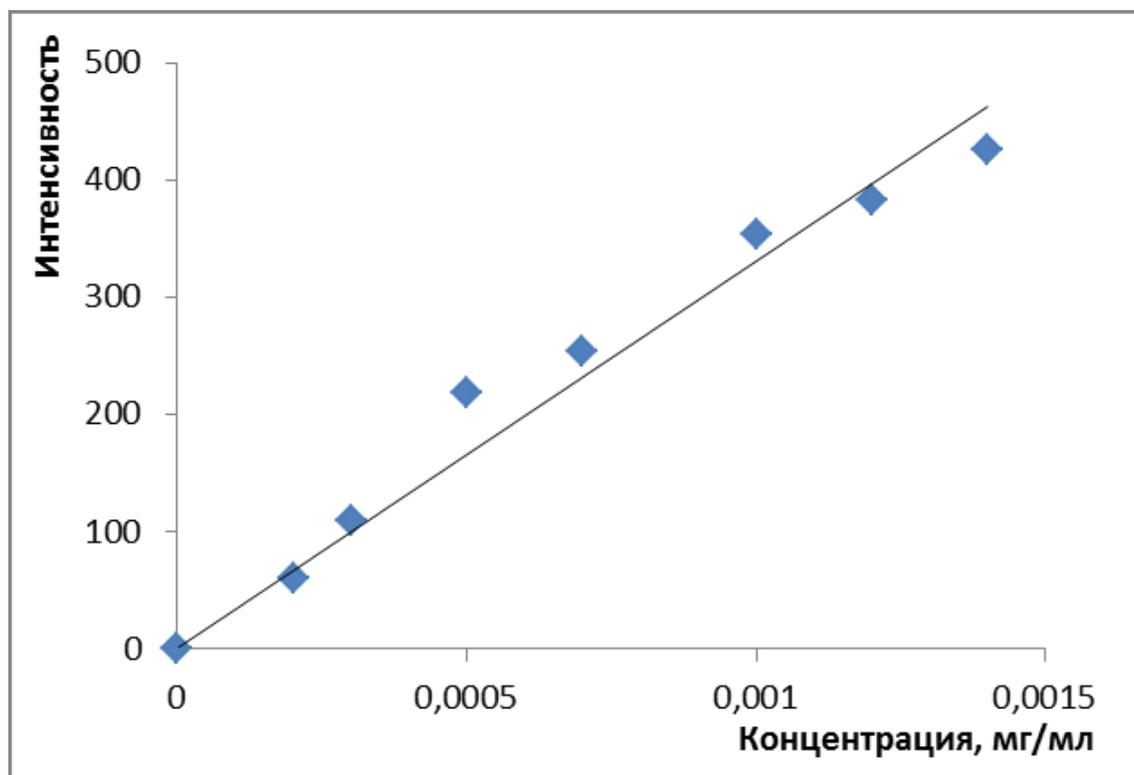


Рисунок 20. Калибровочный график зависимости интенсивности флуоресценции ротора BODIPY 2 от концентрации.

Флуоресцентный имиджинг

Поверхностный флуоресцентный имиджинг 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 нм, экспозиция составила 2 с. Для проведения имиджинга мышей анестезировали 2.5% изофлураном. Изображения получали до внутривенного введения ротора в дозе 10 мг/кг, через 10 мин, 1, 2, 3, 4, 5, 24, 48 и 120 часов после инъекции ротора. Интенсивность флуоресцентного сигнала ((P/S/см²/ср) / (мкВт/см²)) в опухоли оценивали с помощью программы LivingImage, выбирая опухоль в качестве области интереса (ROI). Рассчитывали интенсивность, усредненную по площади новообразования.

Для анализа биораспределения ротора в теле животного была проведена флуоресцентная визуализация *ex vivo*. Через 24 часа после внутривенной инъекции молекулярного ротора, мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков, забирали опухоли и внутренние органы, промывали раствором фосфатно-соляного буфера и получали флуоресцентные изображения на системе IVIS-Spectrum. Среднюю интенсивность флуоресценции опухолевых узлов и органов *ex vivo* определяли количественно по макроскопическим изображениям и нормализовали к соответствующим значениям у мышей с опухолями CT26 без введения молекулярного ротора.

Интенсивность сигнала в опухоли соотносили с сигналом в нормальных тканях. За сигнал от нормальной ткани принимался сигнал от кожи и мышц на противоположном опухоли бедре. Для оценки накопления молекулярного ротора в опухоли использовалось отношение интенсивности сигнала в опухоли к интенсивности сигнала от нормальной ткани.

Многофотонная флуоресцентная микроскопия и FLIM

Для регистрации флуоресценции и времени жизни молекулярного ротора была использована многофотонная флуоресцентная микроскопия в сочетании с FLIM методом. Работа проводилась с использованием многофотонного томографа MPTflex (JenLab, Германия). Многофотонный томограф MPTflex оснащён настраиваемым 80 МГц титан-сапфировым лазером (MaiTai) и FLIM-модулем TCSPC (Becker & Hickl, Германия). Флуоресценцию ротора BODIPY 2 возбуждали на длине волны 850 нм и детектировали в диапазоне 409-660 нм. Средняя мощность на образце *in vitro* и *in vivo* составляла ~ 5 и 12 мВт, соответственно.

Также работа выполнялась с использованием лазерного сканирующего микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного модулем FLIM SPC 150 TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Германия) и фемтосекундным лазером MaiTai HP, 80 МГц, 140 фс (Spectra Physics, США). Двухфотонная флуоресценция BODIPY 2

возбуждалась на длине волны 850 нм и детектировалась в диапазоне от 500 до 550 нм. Изображения FLIM были получены при мощности лазера 1% -2%, время сбора фотонов 60 с.

Изображения строились с помощью масляного-иммерсионного объектива C-Apochromat W Korr (Carl Zeiss, Германия) с x40 увеличением и числовой апертурой 1.3, разрешение изображений составило 512x512 пикселя. В ходе работы дополнительно производилась регистрация изображения в канале проходящего света для визуализации клеточной морфологии и, в дальнейшем, сопоставления ее с областью флуоресценции молекулярного ротора. Время регистрации флуоресценции при получении FLIM изображений составило порядка 60 секунд для того, чтобы количество фотонов в каждом пикселе анализируемой области составляло не менее 5000.

Все эксперименты проводились в затемненном помещении с изолированными от внешнего освещения детекторами для нивелирования вклада шумового сигнала и повышения точности проводимых измерений.

Визуализация флуоресценции молекулярного ротора проводилась при температуре +18 °С. Изображения двухфотонной флуоресцентной микроскопии и FLIM изображения клеток монослоя и сфероидов были получены в течение 15-30 мин после добавления красителя BODIPY. Для получения изображений у лабораторных животных проводилось хирургическое открытие лоскута кожи над опухолью и установка объектива непосредственно на поверхность опухоли. Изображения двухфотонной флуоресцентной микроскопии и FLIM были получены спустя 60 мин после внутривенной инъекции BODIPY.

Анализ времени жизни флуоресценции производился в программе SPImage (Becker & Hickl GmbH, Германия). Изображения с клеточных монослоев и опухолевых сфероидов импортировали в программу, выбирали участки мембраны, в случае клеток опухоли животных – для анализа выбирали опухолевую клетку полностью. Кривые затухания флуоресценции в каждом пикселе изображения

аппроксимировались с использованием моноэкспоненциальной модели, и далее рассчитывалось время жизни флуоресценции τ . Для каждого FLIM изображения анализировали распределение времени жизни флуоресценции и гистограммы соответствия (χ^2). Значение для изображений *in vitro* составило $\chi^2 \leq 1.20$ и для изображений *in vivo* — $\chi^2 \leq 1.40$.

С использованием калибровочных графиков зависимости времен жизни флуоресценции молекулярных роторов от вязкости были определены значения микровязкости для исследуемых объектов.

Патоморфологический анализ опухолей животных

Для проведения патоморфологического анализа, образцы опухолей помещали в 10% раствор нейтрального формалина. Фиксированные формалином образцы ткани обезвоживали по восходящей концентрации спиртов, заливали парафином, готовили срезы толщиной 5–7 мкм с полученных парафиновых блоков с использованием роторного микротомы Leica 450RM (Leica Microsystems, Германия). Полученные срезы окрашивались по стандартной методике гематоксилином и эозином для детального морфологического анализа. Срезы тканей исследовали с помощью микроскопа Leica DM2500 (Leica, Япония).

Масс-спектрометрия ToF-SIMS

Для анализа клетки СТ26, НСТ116 и НСТ116-OXAR выращивали на дне чашки со стеклянным дном (FluoroDishes, Life Technologies) на покровном стекле, покрытом поли-L-лизином в количестве 5×10^5 клеток. Инкубация проводилась в инкубаторе при 37°C и при 5% CO₂ в течение 24 часов. Затем цисплатин (2.6 μ M для СТ26 клеток) и оксалиплатин (2.0 μ M для НСТ116 и НСТ116-OXAR клеток) добавляли в культуральную среду. После 60-минутной или 24-часовой инкубации с соответствующим препаратом клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), а затем клетки инкубировали с 4% параформальдегидом в течение

60 минут при комнатной температуре для химической фиксации. После этого клетки также трижды промывали раствором PBS. Всего было приготовлено по три образца в двух повторностях для каждой клеточной линии – контрольный образец без препарата и клетки, инкубированные с химиопрепаратом в течение 1 и 24 ч. Затем чашку с фиксированными клетками заливали PBS раствором в течение ~5 ч для доставки в лабораторию, где осуществлялся масс-спектрометрический анализ ToF-SIMS. Поскольку анализ ToF-SIMS предполагает исследования в вакууме, была применена процедура дегидратации клеток. Клетки промывали водой mQ для удаления избытка солей. Сушку проводили в слабом потоке аргона при комнатной температуре.

Время-пролетную масс-спектрометрию вторичных ионов проводили на приборе ToF-SIMS 5 (ION-TOF GmbH, Германия), оснащенном источником жидкометаллических ионов Bi^{3+} с энергией 30 кэВ. Для каждого образца было получено 12 масс-спектров в режиме как положительных, так и отрицательных ионов, с площадью анализа 300×300 мкм² и размером 64×64 пикселя. Плотность дозы первичных ионов составляла 4×10^{11} ионов/см² для поддержания статических условий SIMS. Во всех экспериментах для компенсации заряда использовалась низкоэнергетическая электронная пушка. Выходы ионов рассчитывали как интенсивность соответствующего интересующего пика, нормированную на общее количество ионов. 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 каждой временной точки в эксперименте получали по 7-10 полей зрения, обсчет проводили по 30-80 клеткам. Полученные данные представляли 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 вязкости мембран с помощью флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 и метода FLIM in vitro

Для адаптации методики визуализации микровязкости на двумерных клеточных культурах были использованы опухолевые клетки СТ26. Флуоресценцию и её времена жизни регистрировали на многофотонном томографе MPTflex (JenLab, Германия). Изображения обрабатывались в программе SPCImage (Becker & Hickl GmbH, Германия).

Были протестированы флуоресцентные молекулярные роторы – BODIPY C-12 и BODIPY 2. Было показано, что ротор BODIPY C-12 быстро входит внутрь клеток, оценка вязкости плазматической мембраны затруднительна. 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 μM , 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.

Методика визуализации микровязкости мембран опухолевых клеток сфероидов с использованием молекулярного ротора BODIPY 2 и микроскопии FLIM

В качестве трехмерных клеточных культур были использованы сфероиды, сформированные из клеток HeLa Kyoto. Клетки были посеяны на круглодонные планшеты с неадгезивным дном (Corning, Великобритания) в количестве 100 клеток на лунку. На третий день после посадки в лунках формировались сфероиды. Нужно количество сфероидов (8-10) осторожно помещали в чашки со стеклянным дном FluoroDishes, которые затем помещали в CO_2 инкубатор на 2 часа для прикрепления сфероида ко дну чашки. 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 схематично на рисунке 21.

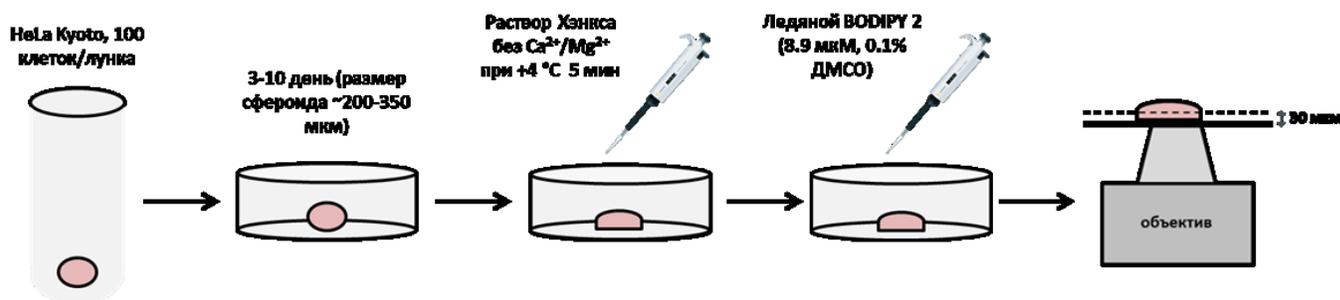


Рисунок 21. Методика вязкостного клеток опухолевого сфероида

Методика измерения вязкости 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 вязкости проводили, когда размер опухолей составлял 7-10 мм. Непосредственно перед экспериментом животное наркотизировали и над опухолью 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 (никотинамидадениндинуклеотид) (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. Имиджинг осуществлялся спустя 1 ч после внутривенной инъекции флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 и длился в течение 20-30 минут. После проведения эксперимента опухолевую ткань забирали для патоморфологического анализа. Методика представлена на рисунке 22.

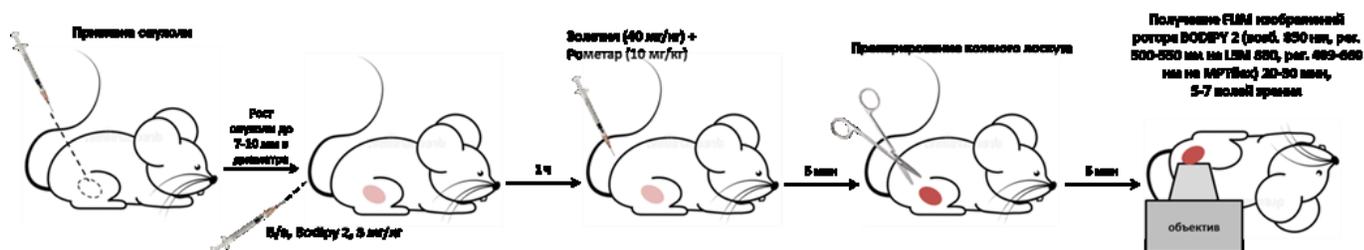


Рисунок 22. Методика визуализации микровязкости клеток опухолей животных *in vivo*.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1 Оценка микровязкости мембран опухолевых клеток в процессе химиотерапии на монослойных культурах

3.1.1 Адаптация методики оценки микровязкости цитоплазматических мембран опухолевых *in vitro* с использованием молекулярного ротора BODIPY 2 и микроскопии FLIM

Первоначально, клетки, не содержащие флуоресцентного молекулярного ротора, были исследованы с помощью многофотонной флуоресцентной микроскопии для оценки уровня автофлуоресценции в используемом спектральном диапазоне при возбуждении на 850 нм и регистрации эмиссии в области 409-660 нм. Было обнаружено, что клетки характеризуются низким уровнем автофлуоресценции в указанном спектральном диапазоне (рис. 23).

FLIM изображения получали одновременно с изображениями многофотонной флуоресцентной микроскопии, по которым выставлялся порог визуализации флуоресценции (Threshold = 25) для учета вклада автофлуоресценции при анализе сигнала молекулярного ротора (рис. 23).

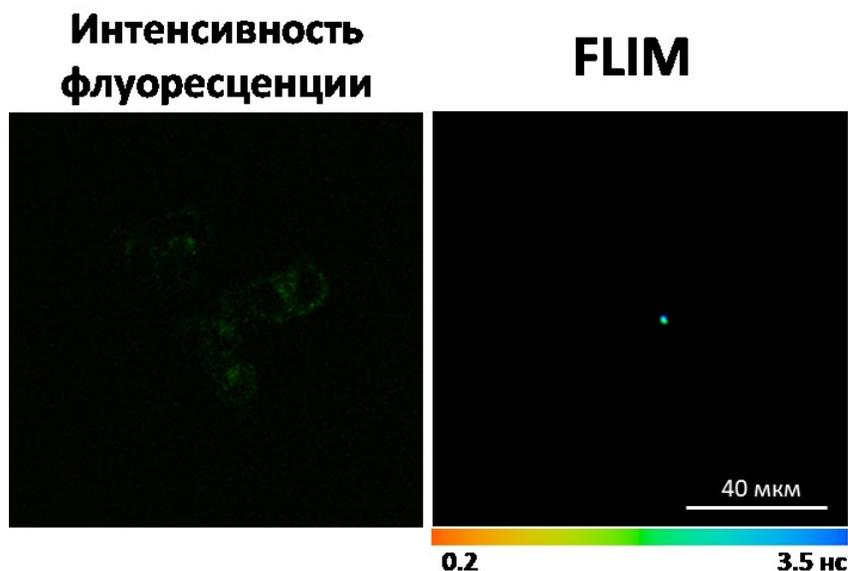


Рисунок 23. Флуоресцентное микроскопическое изображение клеток СТ26,

не содержащих молекулярный ротор BODIPY 2 и соответствующее им FLIM изображение.

Был подобран наиболее оптимальный протокол окраски опухолевых клеток флуоресцентным молекулярным ротором BODIPY 2 [129-130]. Сразу после добавления охлажденного раствора BODIPY 2 к клеткам на мембране клеток появлялось окрашивание с высоким уровнем сигнала флуоресценции, это подтверждает мембранную локализацию молекулярного ротора (рис. 24А).

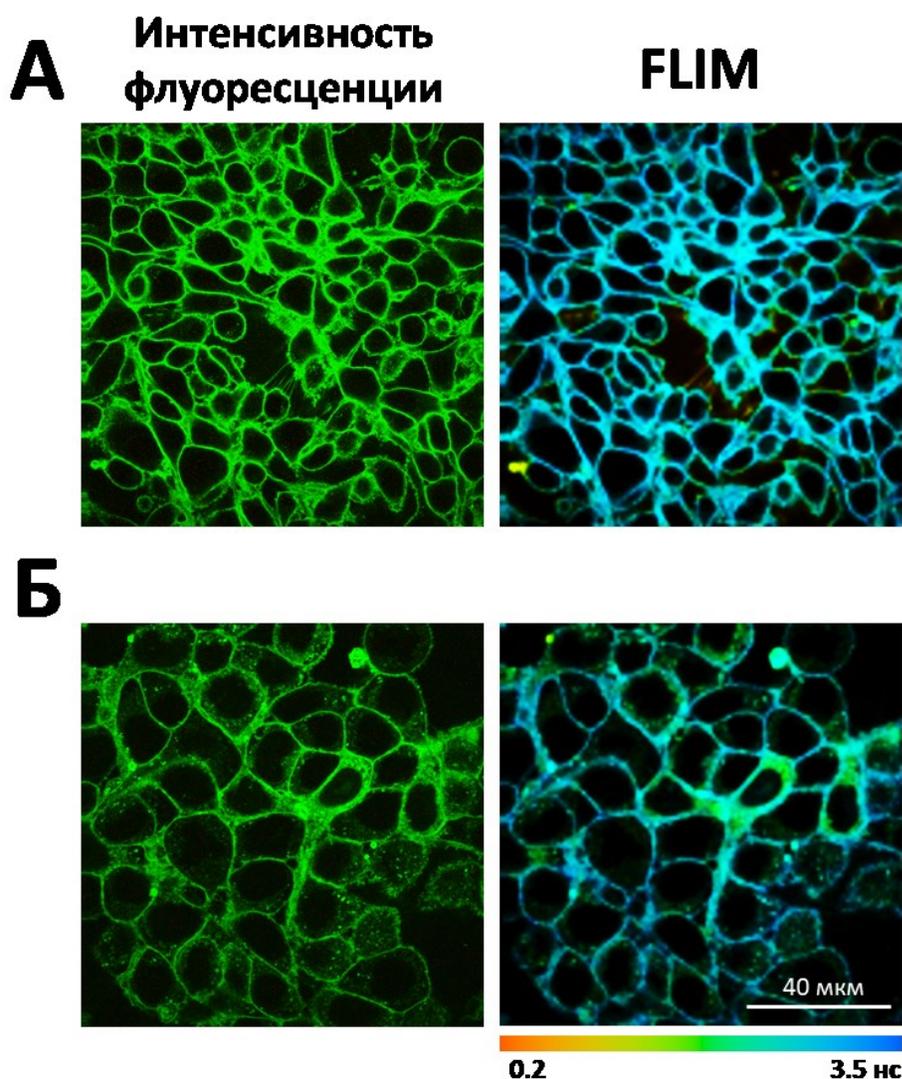


Рисунок 24. Флуоресцентные микроскопические изображения клеток СТ26 с добавлением молекулярного ротора BODIPY 2, инкубированные в растворе Хэнкса

без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} на холоде (А) и инкубированные в растворе Хэнкса с ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} при комнатной температуре (Б) и соответствующие им FLIM изображения.

Результатом использования методики инкубирования клеток в растворе Хэнкса с солями кальция и магния при комнатной температуре было быстрое проникновение флуоресцентного ротора в клетку и окрашивание внутриклеточного содержимого (рис. 24Б).

Время жизни флуоресценции ротора анализировали, выбирая соответствующую область интереса – цитоплазматическую мембрану – при помощи ROIs. Анализ FLIM изображений в программе SPImage показал, что затухание флуоресценции имеет моноэкспоненциальный вид (рис. 25). Критерий хи-квадрат при этом варьирует в диапазоне от 1.09 до 1.24 (рис. 25). Количество фотонов в точке было не ниже 5000.

Важно отметить, что после 30 мин инкубирования опухолевых клеток с молекулярным ротором наблюдался активный эндоцитоз флуоресцентного молекулярного ротора в цитоплазму клетки, как показано на рисунке 26, поэтому оптимальным решением стало ограничение проведения исследования в течение 20 мин после добавления ротора (рис. 26) [130].

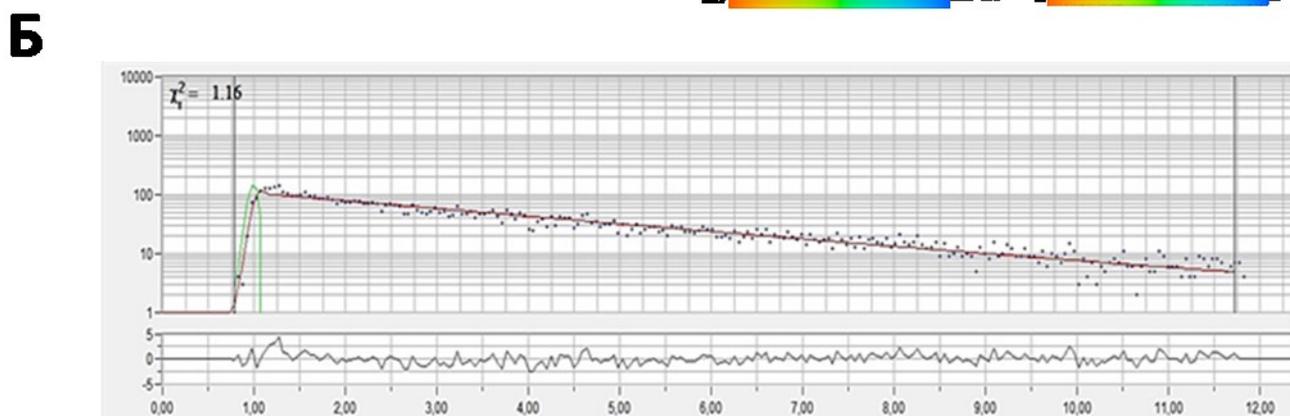
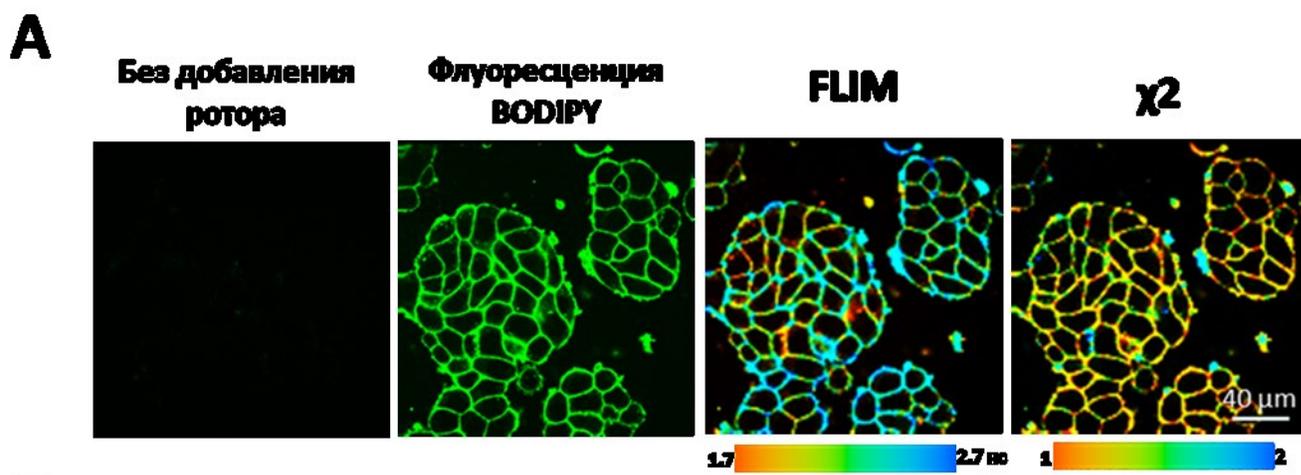


Рисунок 25. Флуоресцентные микроскопические изображения клеток СТ26 без и с добавлением молекулярного ротора BODIPY 2, инкубированные в растворе Хэнкса без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} на холоде и соответствующие им FLIM изображения распределения времени жизни флуоресценции и хи-квадрата (А) и репрезентативное изображение кривой затухания флуоресценции молекулярного ротора BODIPY 2 в мембранах клеток из программы SPCImage.

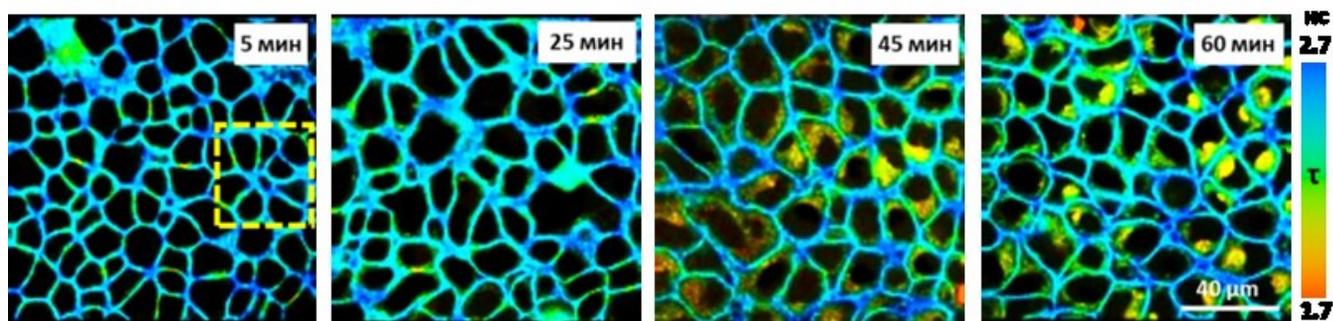


Рисунок 26. FLIM изображения клеток СТ26 с добавлением молекулярного

ротора BODIPY 2, полученные в течение 5-60 минут инкубирования.

Кроме того, было показано, что флуоресцентный молекулярный ротор BODIPY 2 демонстрирует биэкспоненциальное затухание флуоресценции в мёртвых клетках (PI положительные), как показано на рисунке 27. Это свидетельствует о некорректной работе молекулярного ротора, поэтому дальнейшая оценка микровязкости в данных клетках затруднена.

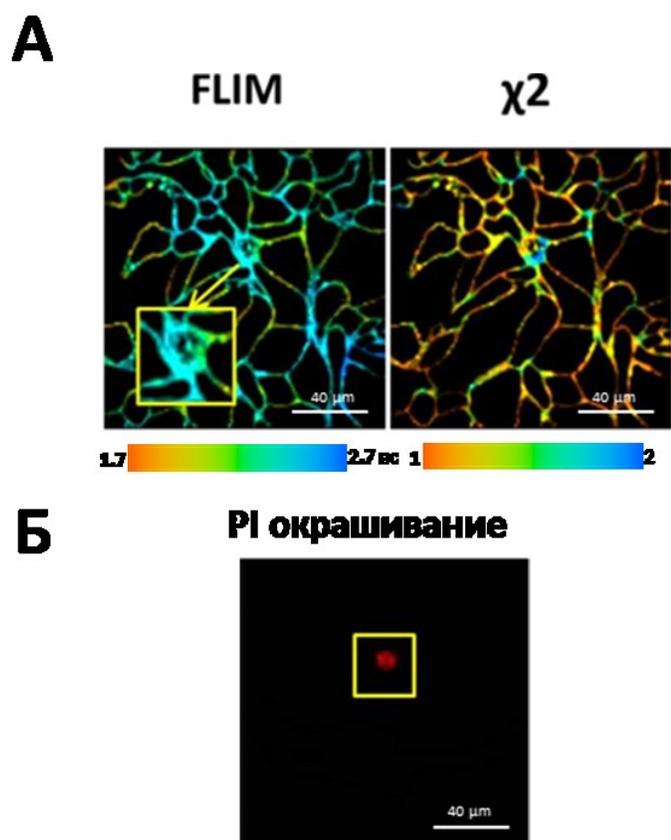


Рисунок 27. FLIM изображение мертвой клетки CT26 с добавлением молекулярного ротора BODIPY 2 и распределение хи-квадрата (А) и верификация мертвой клетки окрашиванием PI (Б).

С помощью молекулярного ротора BODIPY 2 и метода FLIM были получены значения микровязкости мембран для разных клеточных линий: HCT116, HT29, CT26 и HeLa Kyoto (рис. 28) [130].

Показано, что наибольшее время жизни флуоресценции ротора зарегистрировано в мембранах клеток НСТ116 – 3.19 ± 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 ± 0.16 нс, вязкость 362 ± 39 сП. Наиболее жидкими мембранами среди исследуемых линий обладали клетки HeLa Kyoto - время жизни флуоресценции 2.65 ± 0.15 нс, что соответствует значению вязкости 344 ± 36 сП.

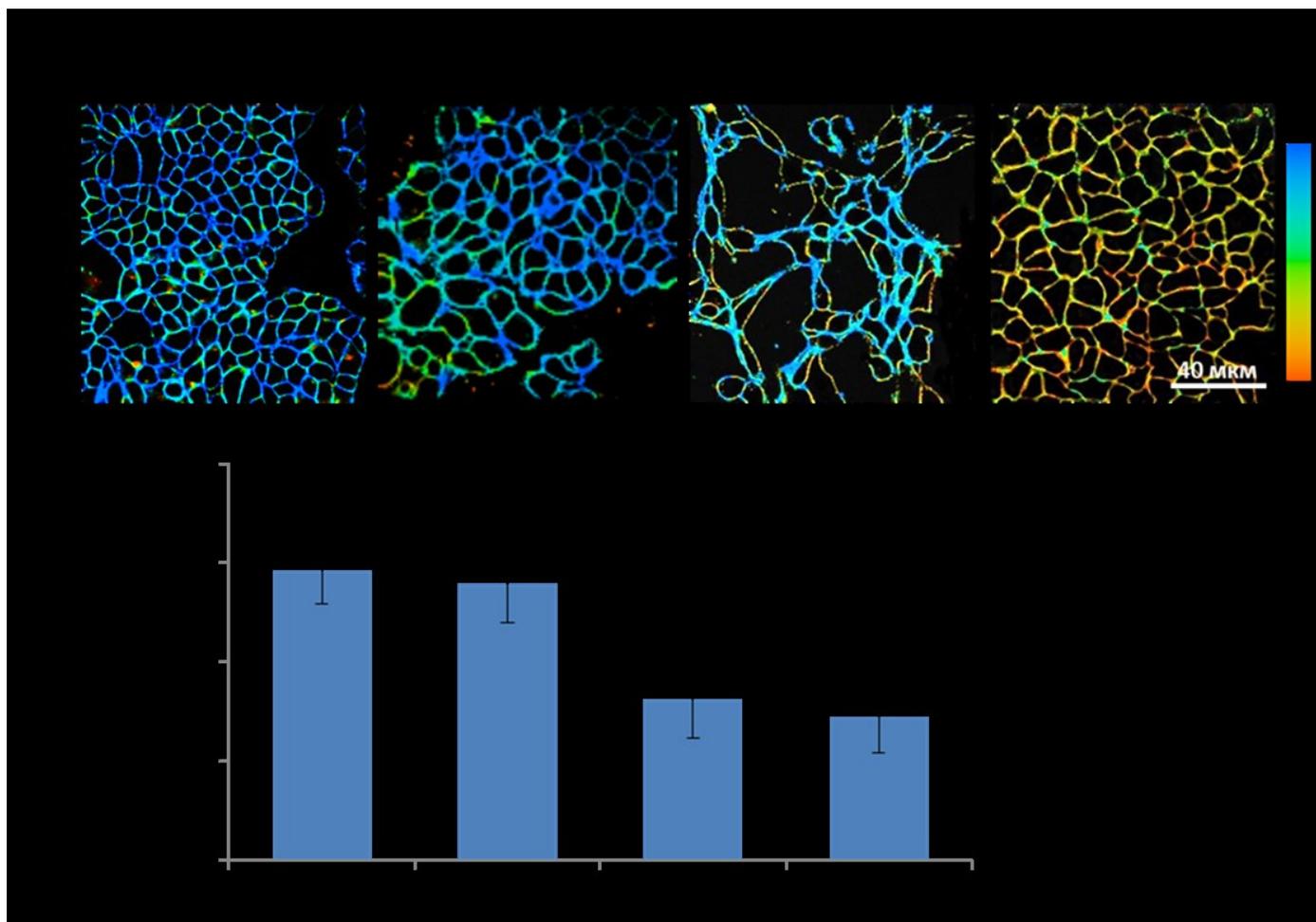


Рисунок 28. Оценка микровязкости плазматической мембраны культивируемых опухолевых клеток с использованием флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 и FLIM. FLIM-изображения клеток НСТ116, НТ29,

СТ26 и HeLa Kyoto, окрашенных BODIPY 2 (А) и количественная оценка микровязкости плазматической мембраны в клетках (Б). Среднее \pm SD, 30-50 клеток.

Таким образом, была адаптирована методика оценки микровязкости цитоплазматических мембран опухолевых клеток *in vitro* с использованием молекулярного ротора BODIPY 2 и микроскопии FLIM в моделях клеточного монослоя для разных линий клеток. С использованием методики показано, что микровязкость цитоплазматической мембраны специфична для разных типов опухолевых клеток.

3.1.2 Исследование изменений микровязкости мембран опухолевых клеток СТ26 и HeLa Kyoto при действии цисплатина

Используя технологию FLIM с флуоресцентным молекулярным ротором BODIPY 2, было проанализировано как меняется вязкость цитоплазматической мембраны в раковых клетках при химиотерапии цисплатином [131].

Важно отметить, что вязкость мембран измерялась только в жизнеспособных клетках, так как в мертвых (PI-положительных) клетках ротор не окрашивал плазматические мембраны, а накапливался внутри клеток, где его флуоресценция затухала биэкспоненциально, что свидетельствует об агрегации ротора.

В клетках СТ26 при воздействии химиопрепаратом, флуоресцентный ротор демонстрировал моноэкспоненциальное затухание флуоресценции, и 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 2.6 мкМ цисплатина микровязкость мембраны снизилась по сравнению с контролем и составила от ~ 290 до 300 сП (различия с контролем статистически не значимы). При дальнейшей инкубации с цисплатином микровязкость мембран опухолевых клеток

увеличилась и через 24 часа стала больше контрольного значения, 397 ± 17 сП ($p \leq 0,005$) (рис. 29).

Для оценки дозозависимого эффекта на вязкость мембран, было протестировано три дозы цисплатина (1,1, 2,3 и 4,5 μM) на клетках HeLa Kyoto (рис. 29). Дозозависимого эффекта не обнаружено, наблюдаемые изменения микровязкости мембран характерны для всех использованных клеточных линий и лечебных доз цисплатина.

Так, например, при инкубировании клеток HeLa Kyoto с цисплатином в дозе 2.3 μM (IC50) снижение микровязкости мембраны наблюдалось в ранние временные точки мониторинга (от 10 до 60 мин), когда вязкость снижалась с 326 ± 22 сП до ~ 300 сП (незначительно). Начиная с 6 ч значение вязкости мембраны увеличивалось, однако статистически значимых отличий не было обнаружено. Через 24 часа инкубации с цисплатином микровязкость мембран значительно возросла составляла 427 ± 26 сП.

Анализ жизнеспособности клеток путем окрашивания пропидиум йодидом (PI) и просветной микроскопии, показал, что большинство обработанных цисплатином клеток оставалось жизнеспособным через 24 часа, хотя их морфология была изменена. После 24 часов инкубации с цисплатином количество мертвых (PI-положительных) клеток HeLa Kyoto увеличилось до 7%, для клеток СТ26 количество мертвых клеток увеличилось до 10%.

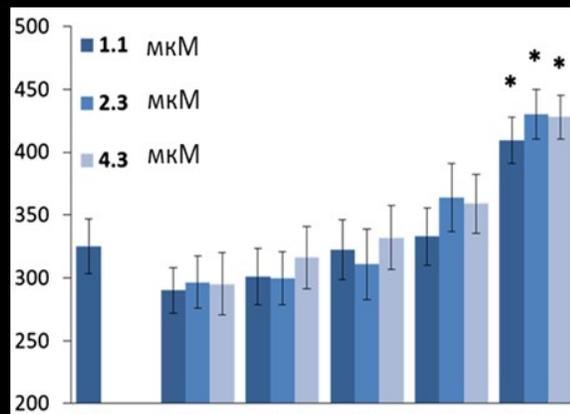
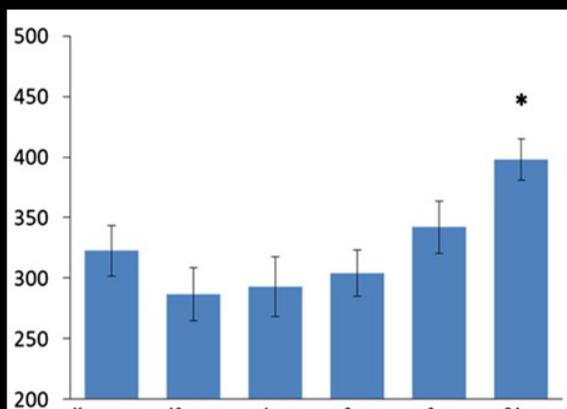
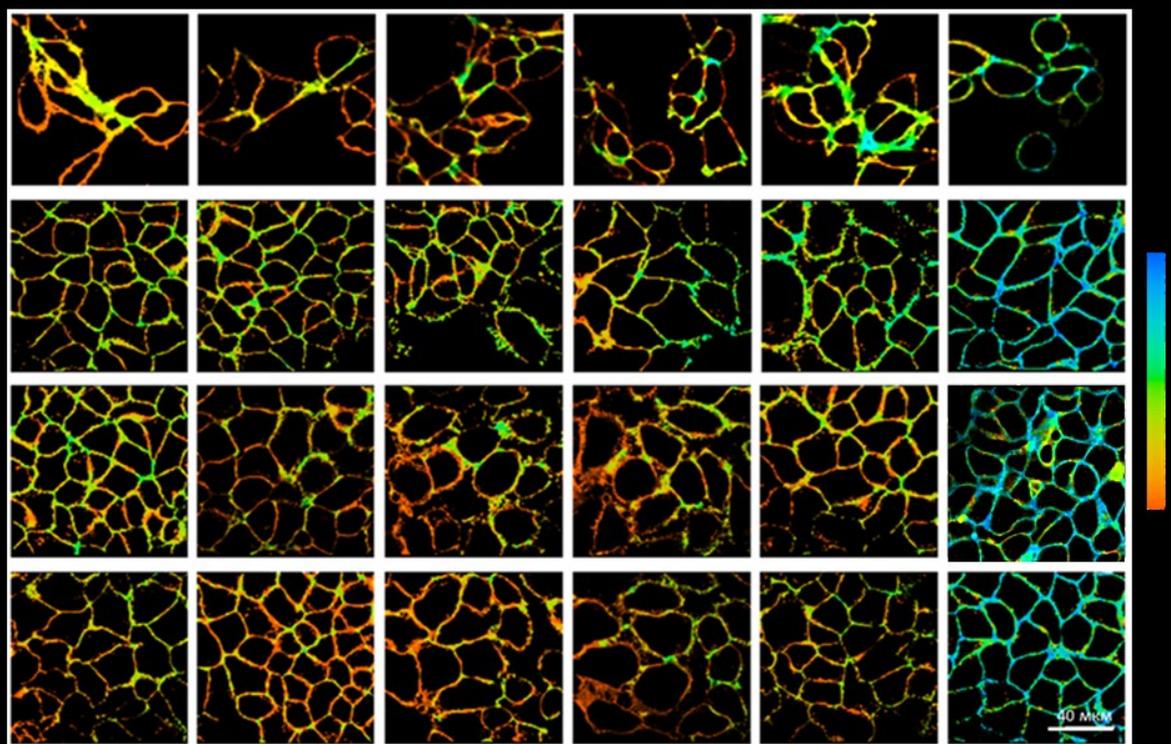


Рисунок 29. Микровязкость плазматической мембраны в клетках СТ26 и HeLa Kyoto до (контроль) и в течение 24 ч воздействия цисплатина. FLIM изображения микровязкости мембран клеток (А), количественная оценка микровязкости мембран клеток СТ26 (Б) и клеток HeLa Kyoto (В) при химиотерапии. Среднее \pm SD, n = 40-50 клеток. *, $p \leq 0,005$ по сравнению с контролем.

В дополнение был проведен эксперимент по измерению микровязкости мембран в монослойных опухолевых клетках через 48 ч после отмены препарата (рис. 30). Было обнаружено, что микровязкость плазматических мембран опухолевых клеток СТ26 и HeLa Kyoto оставалась высокой через 48 ч после отмены препарата и составила 409 ± 12 сП и 417 ± 21 сП, соответственно.

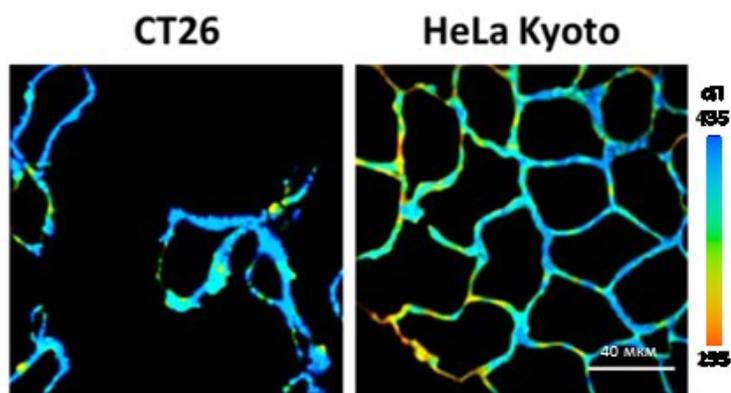


Рисунок 30. Микровязкость плазматической мембраны в клетках СТ26 и HeLa Kyoto через 48 ч после отмены химиопрепарата цисплатин.

Таким образом, было обнаружено, что увеличение микровязкости мембран после 24 ч инкубации с цисплатином характерно для всех исследованных клеточных линий, при этом дозозависимого эффекта не было обнаружено. Зарегистрированные изменения сохраняются после удаления препарата из среды, что позволяет сделать предположение о том, что повышение микровязкости мембран опухолевых клеток после 24 ч инкубации с цисплатином связано с ответом опухолевых клеток на лечение, а не с прямым взаимодействием цисплатина с мембраной опухолевой клетки.

3.1.3 Изучение влияния оксалиплатина на микровязкость мембран химиочувствительных и резистентных клеток

Для выявления эффектов платина-содержащего химиопрепарата на микровязкость мембран резистентных опухолевых клеток, сначала было

проанализировано как изменяется микровязкость плазматической мембраны во время индукции резистентности к оксалиплатину (рис. 31) [132].

Химиорезистентные линии НСТ116-OXAR были получены путем многократного воздействия на клетки малыми дозами препарата оксалиплатин. Регистрацию времен жизни флуоресценции ротора и дальнейший расчёт вязкости осуществляли при дозах 0.1, 0.5, 1, 2 и 8 μM .

При адаптации к минимальной дозе препарата 0.1 μM было зарегистрировано лишь незначительное увеличение времени жизни флуоресценции ротора по сравнению с контролем с 2.84 ± 0.11 нс до 2.91 ± 0.12 нс, что соответствовало увеличению микровязкости с 395 ± 31 сП до 412 ± 35 сП. При увеличении дозы оксалиплатина до 0.5 μM наблюдалось достоверное увеличение времени жизни флуоресценции до 3.13 ± 0.14 нс, что соответствовало вязкости 477 ± 44 сП ($p = 0,0004$). При дальнейшей адаптации к более высоким дозам – 1.0 μM , а затем 2.0 μM - плазматические мембраны сохраняли высокие значения вязкости. Дальнейшее увеличение концентрации оксалиплатина до 8.0 μM приводило к снижению микровязкости до 423 ± 26 сП, что было сопоставимо с контрольным значением - 420 ± 30 сП.

Предполагается, что увеличение вязкости мембраны под действием препаратов платины может быть связано с адаптацией клеток к стрессовым условиям, тогда как возврат к исходному значению на конечной дозе препарата, вероятно, означает, что клетки приобрели свойство устойчивости на биохимическом и физиологическом уровнях, однако микровязкость мембран сравнима с чувствительными клетками.

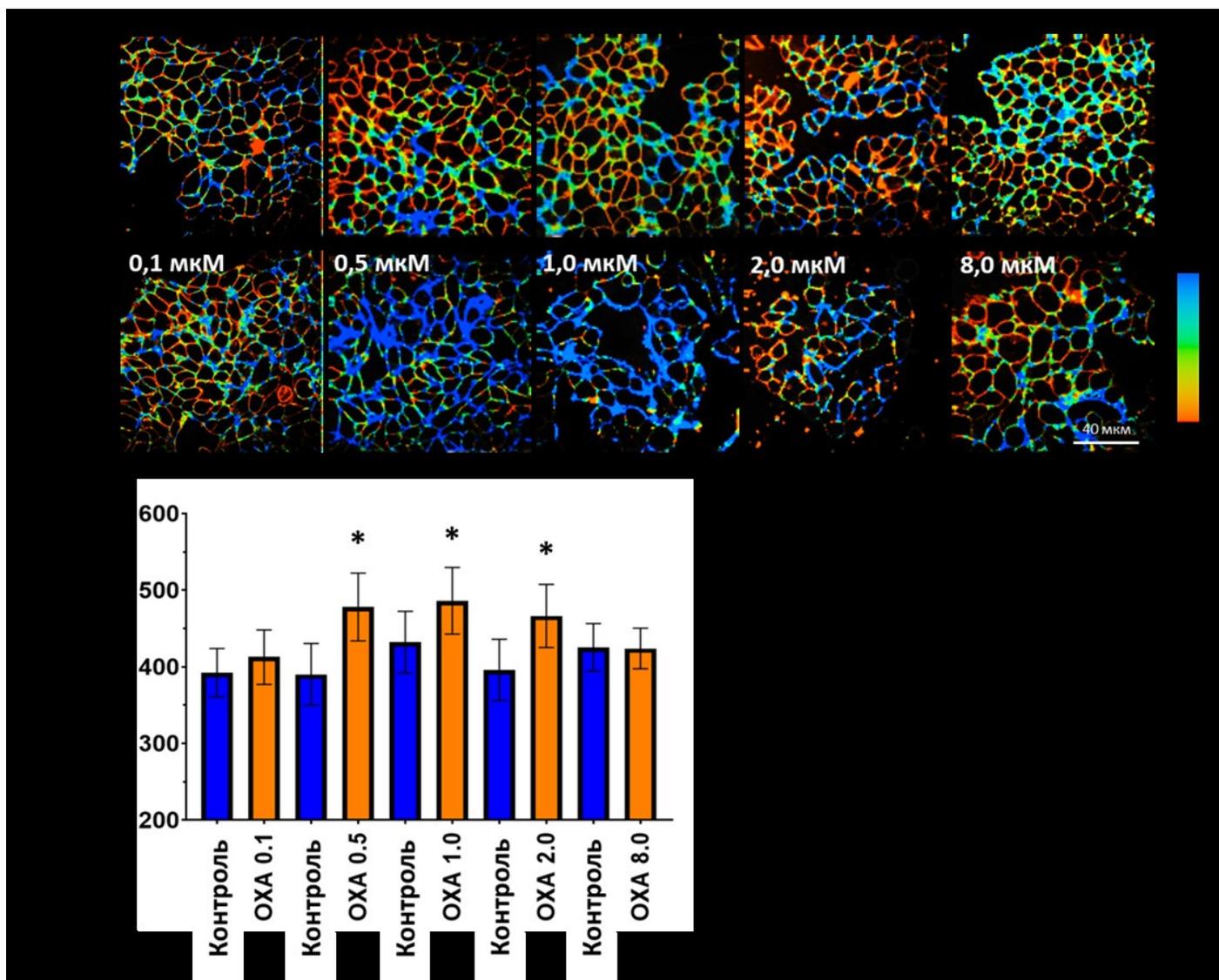


Рисунок 31. Микровязкость плазматической мембраны клеток HCT116 при индукции резистентности к оксалиплатину. (А) - Репрезентативные изображения FLIM контрольных клеток (верхний ряд) и клеток, адаптированных к указанным дозам лекарственного средства (нижний ряд). (Б) - Количественная оценка микровязкости в клетках HCT116. Среднее \pm SD, $n = 30-50$ клеток для каждой дозы препарата. *, $p \leq 0,005$ по сравнению с контролем.

Для выявления эффектов химиопрепарата на микровязкость мембран резистентных опухолевых клеток, опухолевые клетки HCT116 и HCT116-OXAR были проинкубированы с терапевтической дозой оксалиплатина, которая

составила 2.0 μM в течение 1 и 24 ч. В контрольных клетках НСТ116 чувствительных к оксалиплатину, без добавления препарата, время жизни флуоресценции ротора составило 3.01 ± 0.28 нс, что соответствовало микровязкости 437 ± 77 сП. После инкубации с оксалиплатином в течение 1 ч время жизни флуоресценции уменьшилось до 2.74 ± 0.25 нс, что соответствует вязкости 366 ± 63 сП ($p = 0,0037$). После 24-часовой инкубации с препаратом время жизни флуоресценции увеличилось до 3.47 ± 0.41 нс, что указывает на увеличение микровязкости 593 ± 139 сП.

В случае клеток НСТ116-OXAR инкубация с оксалиплатином не влияла на микровязкость мембраны. Время жизни флуоресценции ротора и, соответственно, микровязкость мембран оставались постоянными на уровне и составили ~ 3 нс, что эквивалентно значению вязкости ~ 450 сП. Полученные данные об эффекте оксалиплатина на микровязкость мембран чувствительных и резистентных опухолевых клеток при действии препарата показаны на рис. 32.

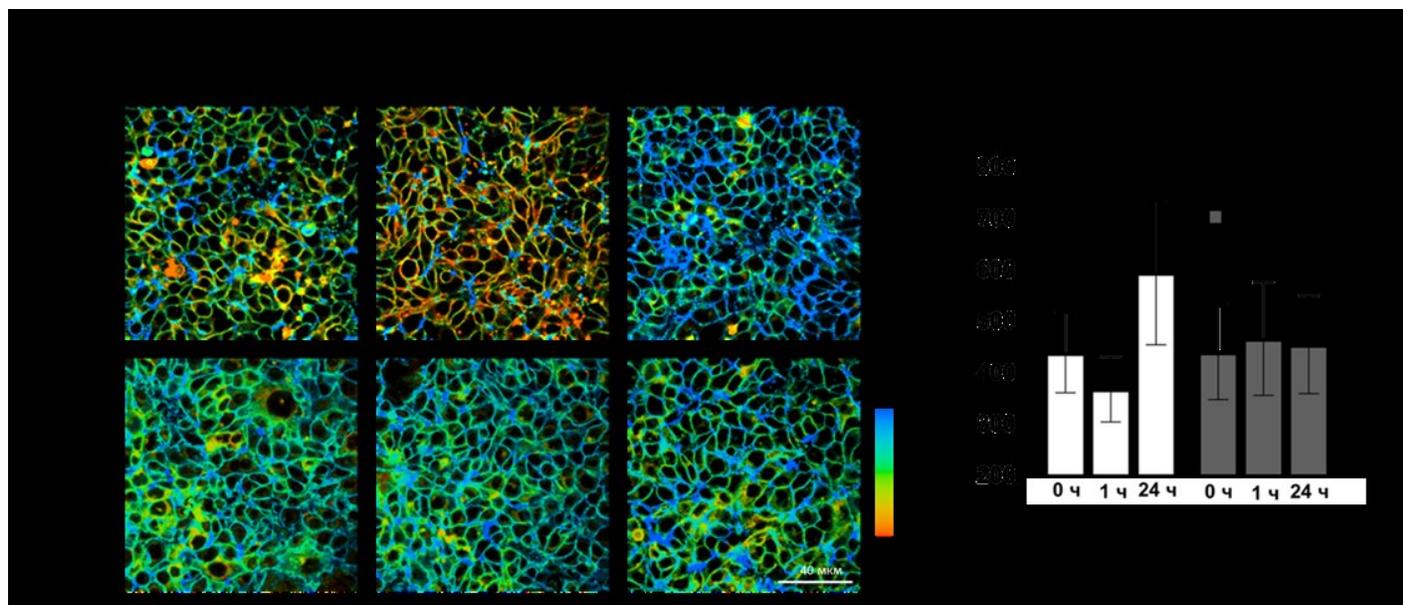


Рисунок 32. Визуализация микровязкости клеточных мембран НСТ116 и НСТ116-OXAR при действии оксалиплатина. Репрезентативные изображения FLIM чувствительных и резистентных клеток НСТ116, инкубированных оксалиплатином в течение 1 ч и 24 ч и контроль без добавления (А). Количественная оценка

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

Таким образом, было выявлено значительное увеличение микровязкости мембран опухолевых клеток НСТ116 при действии оксалиплатина. Динамика этих изменений микровязкости действию химиотерапии согласуется с предыдущими результатами, полученными для клеточных линий HeLa Kyoto и СТ26, инкубированных с цисплатином. При этом, микровязкость мембран резистентных клеток не отличается от чувствительных и не меняется при действии терапевтических доз оксалиплатина.

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

3.2.1 Адаптация методики визуализации микровязкости мембран опухолевых клеток сфероидов с использованием ротатора BODIPY 2 и микроскопии FLIM

Для дальнейшего изучения вязкостных свойств опухолевых клеток *in vitro* была выбрана более сложная трехмерная клеточная культура – опухолевые сфероиды. Эти трехмерные клеточные системы обладают межклеточным взаимодействием и химическими градиентами (кислород, питательные вещества или метаболиты), отражая особенности опухолей *in vivo* и, следовательно, воссоздают сложность человеческих тканей, сохраняя при этом способность к высокопроизводительному скринингу и клеточному анализу.

В качестве 3D модели были использованы опухолевые сфероиды HeLa Kyoto. Протокол окраски для 3D моделей был адаптирован из протокола для монослойных клеточных культур, однако время инкубации в растворе Хэнкса на

льду увеличилось до 10 мин, а концентрация молекулярного ротора была увеличена до 8.9 мкМ [133].

На рисунке 33 показан типичный конфокальный z-стек сфероида, окрашенный ротатором BODIPY 2 на 5-й день роста. К этому времени сфероиды достигают размеров 500–550 мкм. После 5 мин инкубации с раствором ротора наблюдалась яркая флуоресценция, типичная для BODIPY 2. Ротор BODIPY проник на всю глубину сфероида, демонстрируя эффективное окрашивание плазматических мембран клеток на всех глубинах.

Затухание флуоресценции ротора, зарегистрированное на плазматических мембранах клеток, было моноэкспоненциальным, что можно было увидеть из значений χ^2 , близких к 1. Время жизни флуоресценции BODIPY 2 в мембранах клеток опухолевого сфероида было одинаковым и составило около 2.58 ± 0.04 нс, при этом различий между клетками ядра и клетками периферии сфероида не было обнаружено. Согласно калибровочным кривым вязкость мембран клеток HeLa в сфероидах составляла 359 ± 11 сП. Полученные данные хорошо согласуются с данными, полученными ранее для монослойных клеточных культур.

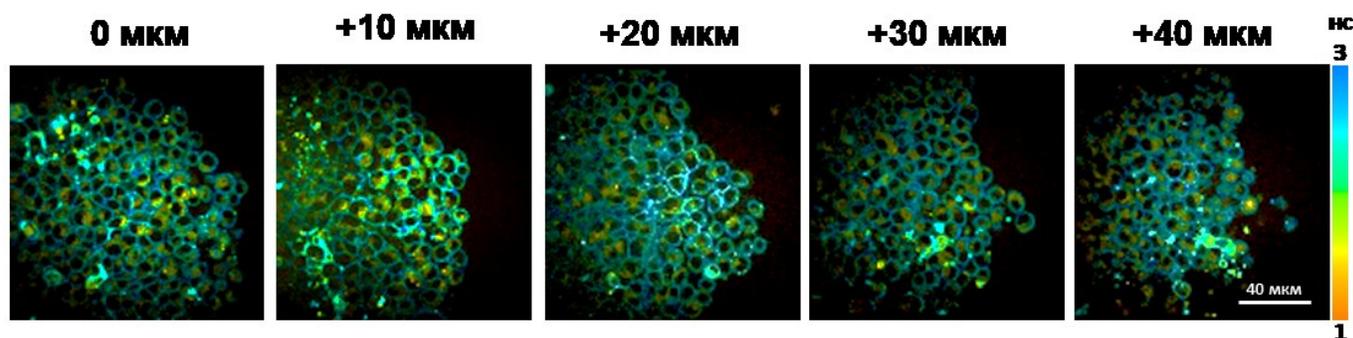


Рисунок 33. FLIM z-стек опухолевого сфероида на 5-ый день роста, окрашенный флуоресцентным молекулярным ротатором BODIPY 2.

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 опухолевых сфероидов).

Мониторинг вязкости проводили с 3 по 10 день роста сфероидов с помощью ротора BODIPY 2 и микроскопии FLIM (рис. 34). На 3-ий день роста сфероиды представляли собой некомпактные агрегаты крупных раковых клеток. К 5 дню сфероиды стали более округлыми и имели компактную структуру, в которой можно было различить более плотное, однородное ядро и внешний слой активно пролиферирующих клеток. К 10 дню сфероиды начинают распадаться из-за большого размера. По мере роста сфероидов их диаметр увеличивался с ~ 400 мкм (3-й день) до ~ 800 мкм (10-й день).

Время жизни флуоресценции BODIPY 2 было проанализировано в центре и на периферии всех сфероидов во всех временных точках. Измерения времени жизни флуоресценции и последующий расчет микровязкости не показали значительных различий между значениями микровязкости, полученными для сфероидов разных размеров, а также между клетками центральной и периферической зонами опухолевого сфероида (рис. 34). Время жизни флуоресценции ротора составляло ~ 2.5 нс, что соответствовало значению вязкости ~ 350 сП.

Таким образом, в ходе адаптации протокола визуализации микровязкости цитоплазматических мембран для 3D опухолевых сфероидов с использованием молекулярного ротора BODIPY 2 и микроскопии FLIM была оценена микровязкость мембран клеток опухолевого сфероида HeLa Kyoto в процессе его роста. Статистически значимых отличий обнаружено не было для сфероидов разного размера и для внутреннего и внешнего слоев клеток сфероида. Полученные данные показывают, что микровязкость мембран клеток сфероида не зависит от метаболической активности клеток, а также от неоднородности клеточного микроокружения.

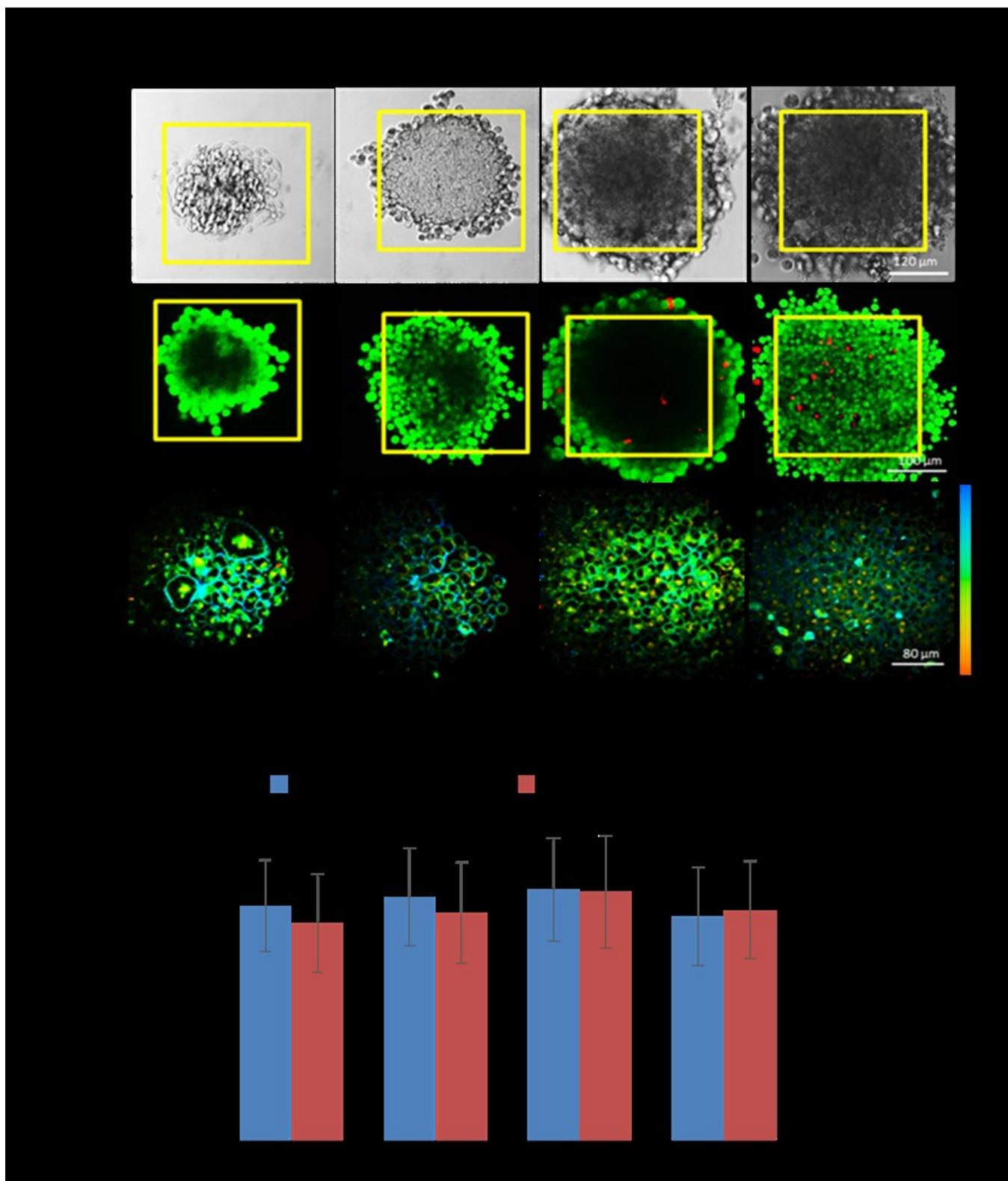


Рисунок 34. Микровязкость плазматической мембраны в клетках опухолевого сфероида HeLa Kyoto при его естественном росте с 3-его по 10-ый день. Просветные изображения, результирующие изображения анализа живых

(кальцеин)/мертвых (PI) клеток и FLIM изображения микровязкости мембран клеток сфероидов HeLa Kyoto. Количественная оценка микровязкости мембран клеток внутреннего и внешнего слоев сфероидов на разных стадиях его роста. Среднее \pm SD, n = 40-50 клеток.

3.2.2 Анализ изменений микровязкости мембран клеток опухолевых сфероидов при действии цисплатина

Анализ изменений микровязкости мембран клеток опухолевых 3D сфероидов при химиотерапии цисплатином осуществлялся на опухолевых сфероидов HeLa Kyoto [131]. Для имиджинга были взяты многоклеточные плотные опухолевые сфериды 5 дней роста, \sim 350 мкм в диаметре, в котором можно было различить внешний слой пролиферирующих клеток и внутреннее, более плотное ядро

Были оценены изменения морфологических признаков сфероидов при инкубации с цисплатином. Хотя обработка цисплатином не повлияла на размер сфероидов, была обнаружена структурная дезорганизация сфероидов после 24- и 48-часового воздействия (рис. 35). Показано, что к 24-48 ч инкубации опухолевый сфероид теряет свою плотную структуру, ядро становится более светлым, а клетки периферии становятся более разрозненными.

Несмотря на то, что воздействие цисплатином не повлияло на размер и скорость роста сфероидов, было обнаружено увеличение количества мертвых клеток в сфероидов (PI-положительных) с увеличением времени инкубации (рис. 35).

При этом микровязкость мембран клеток опухолевого сфероидов HeLa Kyoto была идентична клеткам в монослое, 325 ± 29 сП. В первые часы инкубации с цисплатином не было зарегистрировано флуктуаций микровязкости мембран клеток сфероидов, микровязкость при этом примерно составляла \sim 340 сП. Только через 24-

48 ч инкубации с цисплатином было зарегистрировано резкое увеличение микровязкости до 425 ± 25 сП ($p = 0,00035$) (рис. 35).

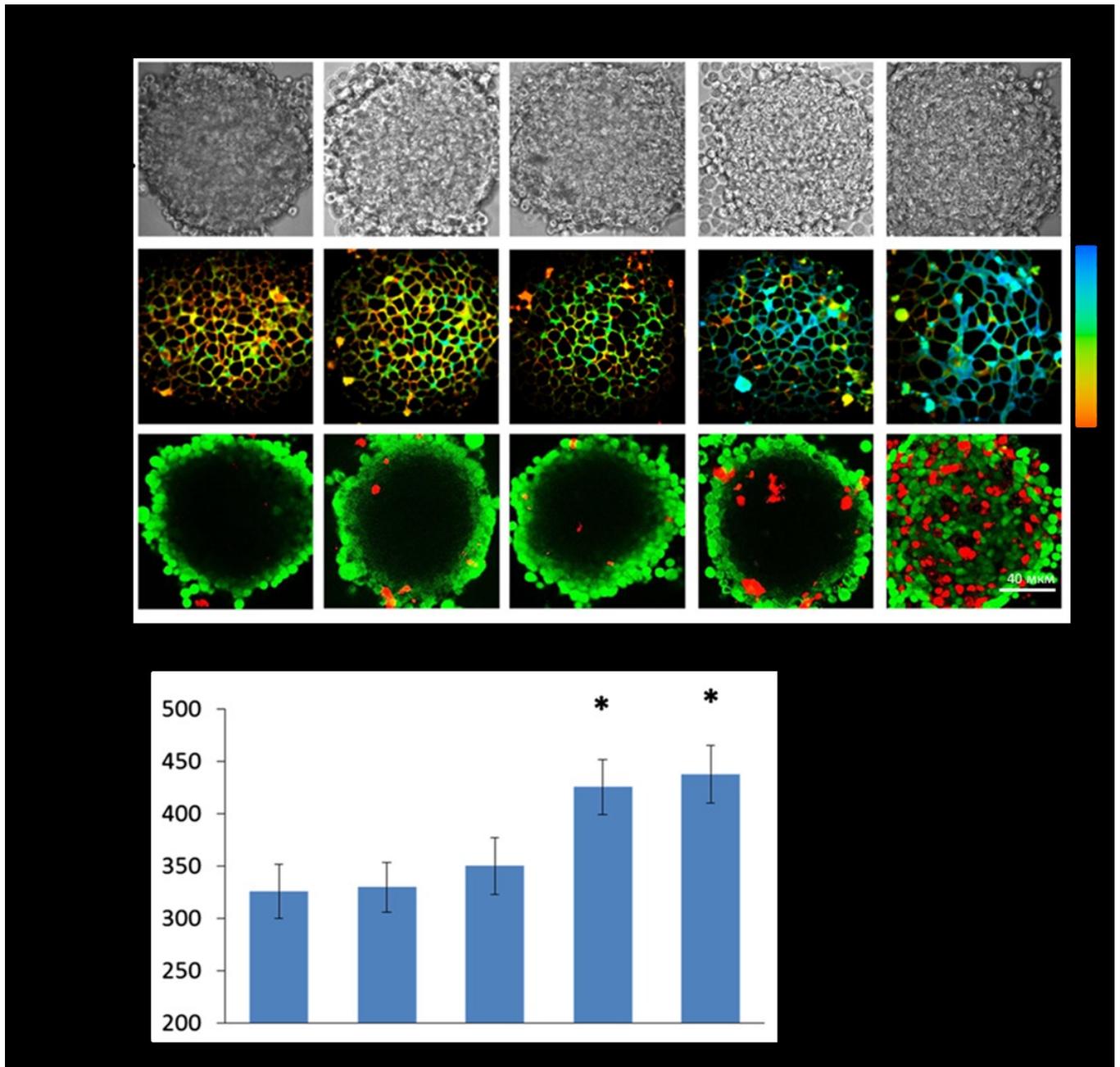


Рисунок 35. Микровязкость плазматической мембраны опухолевых сфероидов HeLa Kyoto до (контроль) и в течение 48-часового воздействия цисплатином. Просветные изображения, анализ живых (кальцеин)/мертвых (PI) клеток и FLIM изображения. Количественная оценка микровязкости при действии

цисплатина. Среднее \pm SD, n = 4 сфероидов по 20 клеток в каждом. * Статистически значимая разница с контролем, $p \leq 0,005$.

Результаты экспериментов, проведенных на монослоях клеток и 3D сфероидов, демонстрируют, что зарегистрированные значимые увеличения микровязкости в разных моделях организации, наблюдаемые при длительном воздействии препаратов платинового ряда (≥ 24 ч), не были напрямую связаны с гибелью клеток, поскольку наблюдаемые изменения вязкости были одинаковыми для всех клеток в клеточной популяции, в том числе для тех, кто умер, и тех, кто выжил после лечения цисплатином. Это позволяет нам предположить, что увеличение микровязкости мембраны может быть ранним адаптивным ответом на стрессовые условия (например, повреждение ДНК), частью механизмов ответа клетки на проводимую терапию.

3.3 Исследование микровязкости клеток опухолей животных *in vivo* при химиотерапии

3.3.1 Исследование биораспределения и фармакокинетики флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 в организме мыши с опухолью СТ26

Перед визуализацией микровязкости клеток опухолевой ткани животных *in vivo*, было выполнено фармакологическое исследование, а также было оценено биораспределение молекулярного ротора в организме мышей [129]. Исследования проводились на мышах линии Balb/C с подкожно привитыми опухолями СТ26. Молекулярный ротор вводили в хвостовую вену в концентрации 3 мг/кг, получение данных проводилось до и через 10 мин, 1, 2, 3, 4, 5, 24, 48 и 120 ч .

Так, внутривенное введение BODIPY 2 животным приводило к увеличению интенсивности флуоресценции в опухоли, что свидетельствовало о накоплении

ротора в опухолевой ткани, однако без выраженной селективности (рис. 36). BODIPY 2 демонстрировал максимальный сигнал флуоресценции в опухоли в период от 15 мин до 6 часов после внутривенного введения. Через 24 часа после введения ротор оставался в опухоли в относительно высокой концентрации.

Детальное изучение биораспределения, основанное на флуоресценции органов *ex vivo* выявило, что наибольшее содержание молекулярного ротора было в органах, ответственных за выведение препарата из организма – толстой кишке, печени и коже. Почки также были задействованы в выведении препарата в течение 24 часов после внутривенного введения. В других тканях концентрация BODIPY 2 уменьшалась в следующем порядке: опухоль > легкие > мышцы > сердце > селезенка (рис. 36).

На рисунке 37 показано отношение интенсивности сигнала в опухоли к интенсивности сигнала в нормальных тканях. Показано, что к 5 часам интенсивность сигнала в опухоли возрастает в 1.5 раза по отношению к нормальной ткани. Спустя 5 часов ротор начинает выходить из нормальных тканей, а в опухоли задерживается, что видно из количественного анализа флуоресценции (рис. 37).

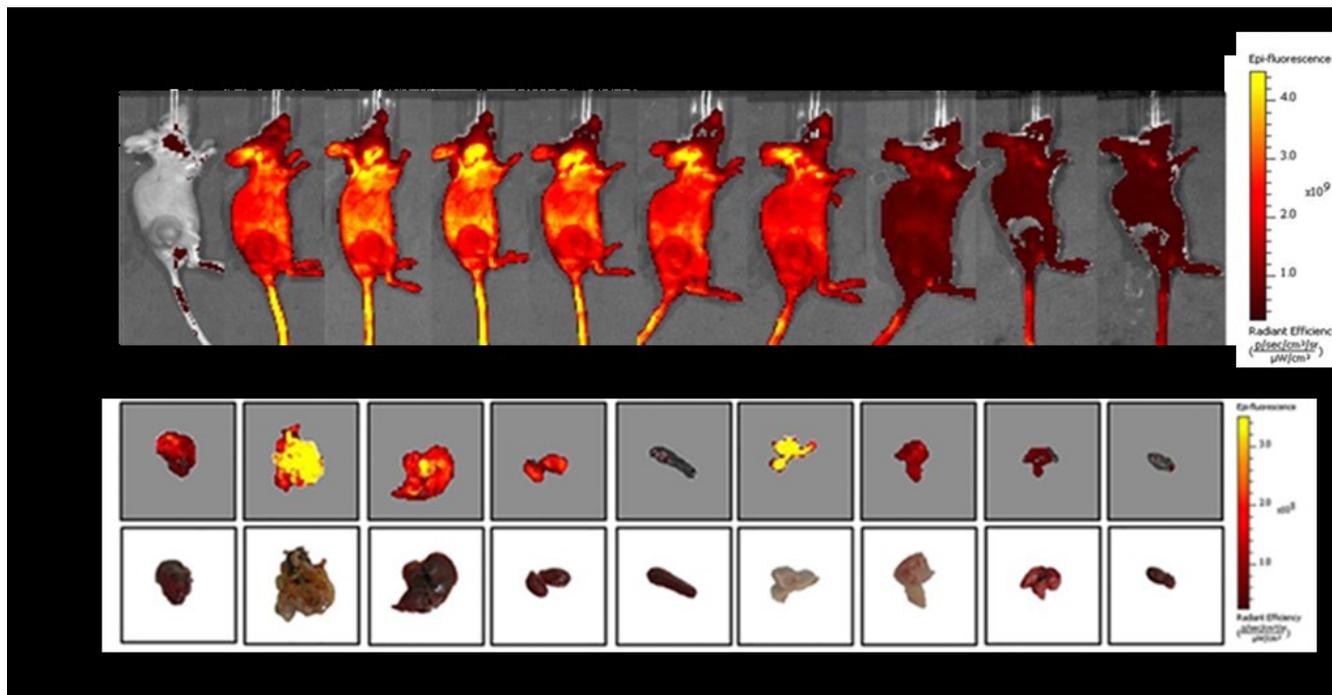


Рисунок 36. Биораспределение флуоресцентного молекулярного ротора

BODIPY 2 с течением времени в организме мыши *in vivo*.

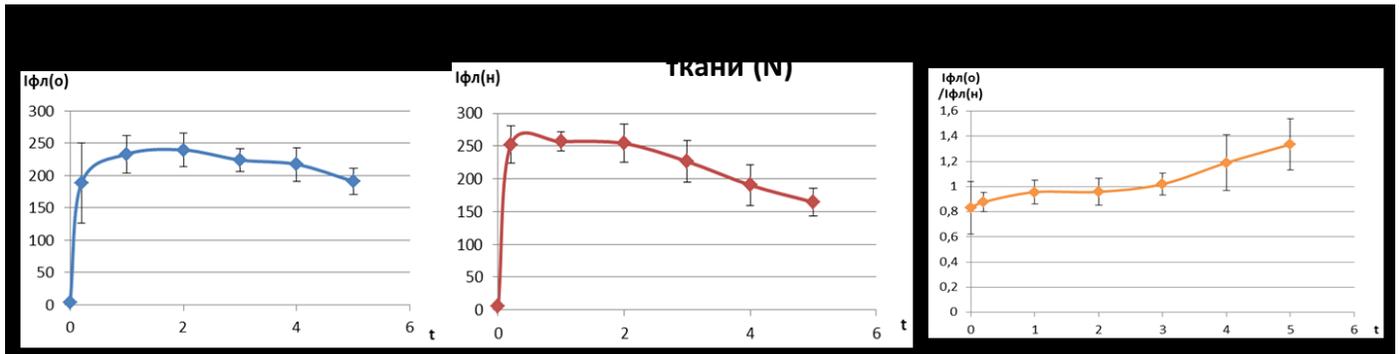


Рисунок 37. количественная оценка флуоресценции молекулярного ротора BODIPY 2 в опухоли, в нормальной ткани и отношение флуоресцентного сигнала в опухоли к сигналу нормальной ткани.

Исследование фармакокинетики флуоресцентного ротора в плазме крови мышей показало, что ротор достаточно долго циркулирует в кровяном русле животных. Высокий сигнал флуоресценции наблюдается в первые минуты после инъекции. Анализ кинетики BODIPY 2 в плазме крови показал постепенное снижение концентрации с полным выведением из кровотока через 48 часов после инъекции (рис. 38).

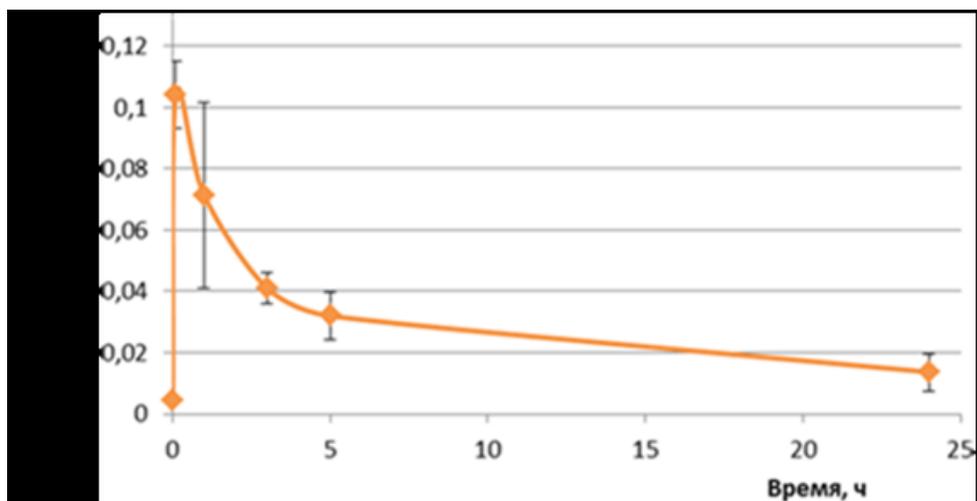


Рисунок 38. Оценка фармакокинетики флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 в плазме крови мыши с подкожной опухолью СТ26.

Период полувыведения ротора из кровяного русла мышей составляет 3 часа. Следует отметить, что у мышей не наблюдалось острых токсических эффектов от внутривенного введения ротора.

Механизм накопления флуоресцентного молекулярного ротора в опухолевой ткани обусловлен эффектом повышенной проницаемости и удержания (EPR – enhanced permeability and retention effect). В основе этого эффекта лежит явление перфорированных кровеносных сосудов. Сосуды в опухоли, как правило, имеют нарушенную структуру и большое количество разрывов, а также отсутствие в опухолевой ткани хорошего лимфодренажа [10].

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что ротор нетоксичен, водорастворим и безопасен для исследований на лабораторных животных. Молекулярный ротор неспецифично накапливается в опухолевой ткани благодаря механизму повышенной проницаемости и удержания.

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

Для измерения микровязкости клеток опухолей мышей *in vivo* мышам подкожно на правое бедро прививались опухолевые клетки, при достижении опухолями 7-10 мм в диаметре производилось исследование микровязкости опухолевых клеток. Животным внутривенно вводился раствор флуоресцентного молекулярного ротора в дозе 3 мг/кг, и затем осуществлялась визуализация микровязкости с помощью метода FLIM.

Перед визуализацией, мышей наркотизировали смесью рометра и золетила, и препарировали кожный лоскут для более эффективного прохождения сигнала. Тело мыши размещали таким образом, чтобы объектив микроскопа плотно прилегал

к опухолевой ткани. Для получения изображений микровязкости опухолевых клеток сначала проходила их идентификация и настройка фокуса в канале автофлуоресценции НАДН. Сфокусировавшись на опухолевой ткани, выполнялось переключение в канал регистрации флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 и дальнейшее получение FLIM изображений.

При анализе FLIM изображений был подобран порог отсечки для нивелирования вклада собственной автофлуоресценции опухолевых клеток (Threshold = 50). Анализ кривых затухания флуоресценции молекулярного ротора в опухолевой ткани показал диффузное распределение молекулярного ротора в клетках опухоли, с преимущественной локализацией в плазматических мембранах. Было показано, что молекулярный ротор BODIPY 2 имеет моноэкспоненциальный характер затухания флуоресценции в клетках опухолей, при этом микровязкость клеток СТ26 составила 265 ± 16 сП и 276 ± 22 сП для клеток НСТ116 (рис. 39).

Мониторинг микровязкости клеток опухолевой ткани с помощью метода флуоресцентной микроскопии с опцией FLIM на мышах с подкожной опухолью СТ26 показал, что в течение первых часов после внутривенного введения в дозе 3 мг/кг наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции, что свидетельствует о накоплении ротора в опухолевой ткани (рис. 39) [129]. Также было показано, что регистрируемые времена жизни флуоресценции и, соответственно, микровязкость опухолевых клеток не изменялись при мониторинге в течение 80 минут (рис. 39).

Следует отметить, что значения времен жизни флуоресценции, зарегистрированные в опухолевых клетках *in vivo* немного меньше времён, зарегистрированных в культивируемых клетках СТ26 и НСТ116. Это может быть объяснимо тем, что ротор имеет диффузный характер распределения в клетках опухоли *in vivo* – распределяется по всей клетке с преимущественным накоплением в клеточной мембране. Это вносит вклад в измерение микровязкости, т.к. ротор в цитозоле клетки имеет очень низкие времена жизни флуоресценции [13].

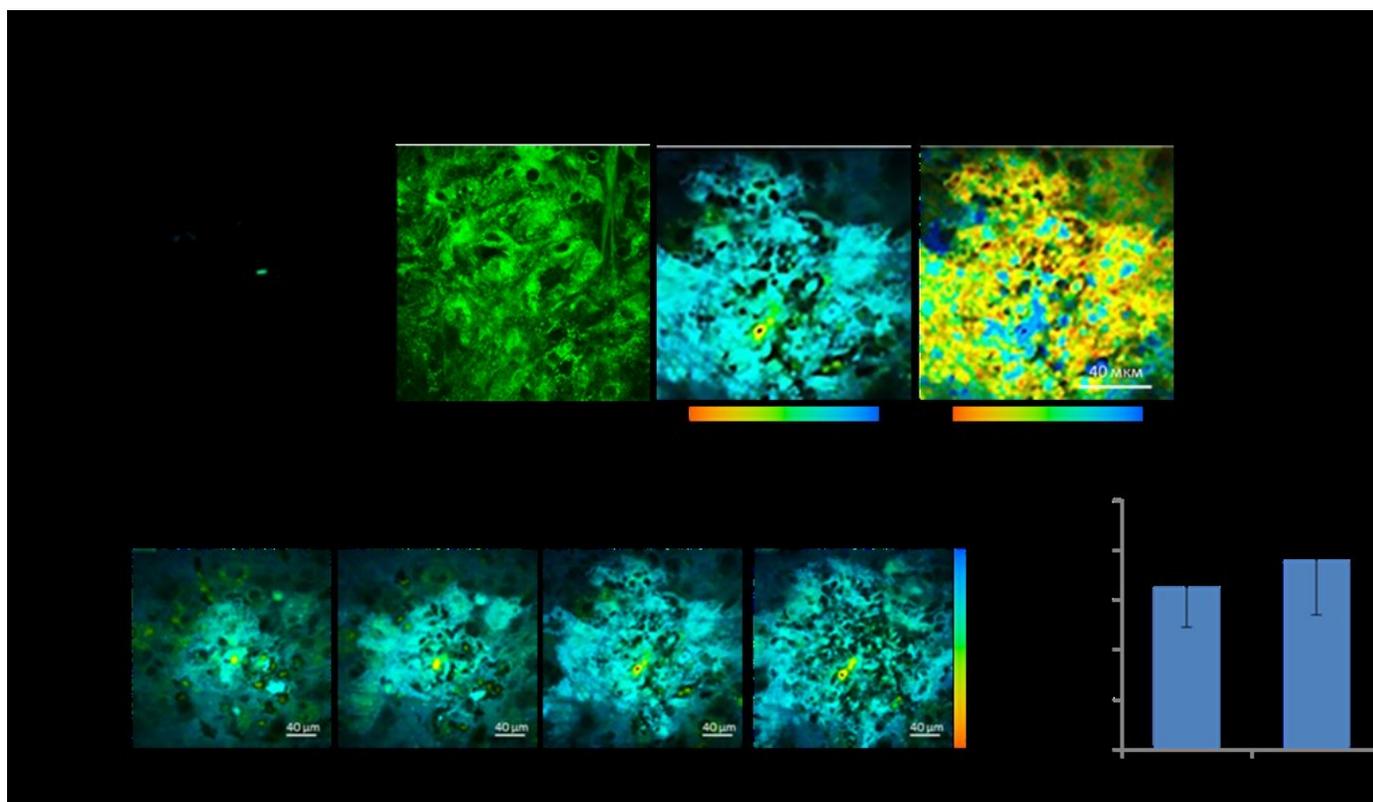


Рисунок 39. Флуоресцентные и FLIM изображения опухоли СТ26 у мышей Balb/C через час после введения ротора BODIPY 2 (А) и мониторинг изменения значений времен жизни флуоресценции ротора BODIPY 2 в опухоли СТ26 в течение 80 минут (Б).

Таким образом, выполненное исследование впервые демонстрирует возможность *in vivo* мониторинга микровязкости клеток опухолей *in vivo*, что может открыть новые перспективы для диагностики и контроля эффективности терапии рака.

3.3.3 Исследование микровязкости чувствительных и резистентных опухолевых клеток *in vivo* при действии оксалиплатина

С помощью адаптированной методики была исследована микровязкость чувствительных и резистентных опухолевых клеток *in vivo* при действии оксалиплатина [132]. Были проведены эксперименты *in vivo* на опухолях мышей,

созданных из клеточных линий НСТ116 и НСТ116-OXAR (рис. 40). Измерение микровязкости проводили с инъекцией флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 в хвостовую вену мышей, визуализация микровязкости осуществлялась через 1 ч.

Было зарегистрировано ингибирование роста опухолей НСТ116 к 23-му дню при воздействии оксалиплатином, что сопровождалось выраженными патоморфологическими изменениями — обширными кровоизлияниями, дистрофические изменения в жизнеспособной ткани, снижение митотической активности (рис. 40). Патоморфологический анализ опухолей всех исследуемых групп показал, что морфология опухолей НСТ116 без воздействия, и опухолей НСТ116-OXAR без и с воздействием оксалиплатином в целом была сходной. Опухоли представлены плотными комплексами раковых клеток с крупными ядрами и слабобазофильной цитоплазмой. Митотическая активность была высокой, особенно на периферии узелков. Области спонтанного некроза были незначительными. В опухолях НСТ116, после воздействия оксалиплатином, наблюдались кровоизлияния и обширные поля некроза. В опухолевых клетках жизнеспособной ткани наблюдались дистрофические изменения — потеря целостности мембран и отек цитоплазмы. Морфология же резистентных клеток осталась без изменений после проведения химиотерапии. В ходе эксперимента был выявлен эффект воздействия оксалиплатином на чувствительных опухолях НСТ116, который отражается не только на морфологии клеток, но и на её биофизических свойствах, в частности на микровязкости.

Время жизни флуоресценции ротора в клетках контрольной НСТ116 и резистентной НСТ116-OXAR опухолях без воздействия оксалиплатином было одинаковым и составило 2.38 ± 0.12 нс и 2.37 ± 0.07 нс соответственно, при этом микровязкость клеток опухолей составила 268 ± 22 сП и 272 ± 18 сП, соответственно (рис. 40). Как и в модели *in vitro*, в резистентных опухолях микровязкость не изменилась после воздействия оксалиплатином и составила 258 ± 30 сП. В то же

время в чувствительных к оксалиплатину опухолях было зарегистрировано увеличение времени жизни флуоресценции ротора до 2.64 ± 19 нс, что соответствует вязкости 357 ± 44 сП ($p = 0,00039$ для нелеченых опухолей НСТ116). Следовательно, эти результаты, полученные *in vivo*, хорошо соответствуют данным *in vitro* и позволяют предположить, что повышенная вязкость мембраны является индикатором ответа опухоли на терапию.

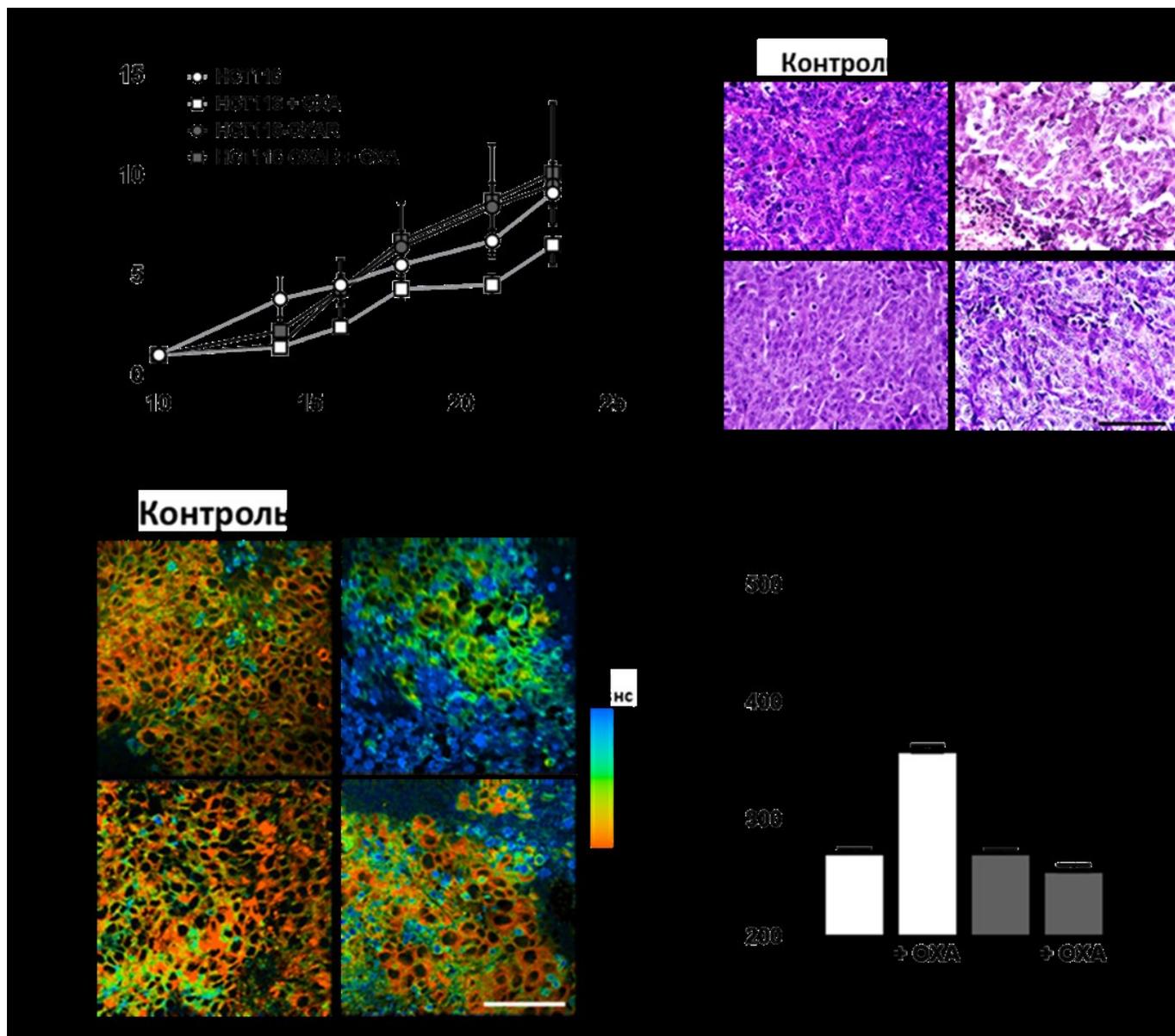


Рисунок 40. Микровязкость мембран в чувствительных к оксалиплатину и резистентных опухолях. Динамика роста нелеченых опухолей НСТ116 и НСТ116-OXAR без и после действия оксалиплатина (А), объемы опухоли нормализовали к

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 вязкости опухолей *in vivo*. Проведено сравнение вязкости чувствительных и резистентных к оксалиплатину опухолевых клеток в условиях *in vivo*. Результаты, полученные *in vivo*, хорошо коррелируют с данными *in vitro* и позволяют предположить, что повышенная вязкость мембраны является индикатором ответа опухоли на терапию.

3.4 Анализ липидного состава мембран опухолевых клеток при химиотерапии методом масс-спектрометрии ToF-SIMS

Известно, что микровязкость мембран во многом обусловлена качественным и количественным липидным составом. Для выяснения причин зарегистрированного повышения микровязкости мембран при действии препаратами платинового ряда был произведен масс-спектрометрический анализ с помощью время-пролетной масс-спектрометрии ToF-SIMS [131-132].

Так, для клеток СТ26 инкубированных с цисплатином в течение 24 ч было зарегистрировано увеличение сигнала сфингомиелина на 20% и холестерина на 70% (рис. 41). Холестерин известен как регулятор жесткости мембран, поэтому полученные данные хорошо соответствуют с увеличением микровязкости,

зарегистрированным с помощью метода FLIM и молекулярного ротора BODIPY 2 на той же клеточной линии при химиотерапии. Кроме того, было обнаружено и уменьшение сигнала моно- и полиненасыщенных жирных кислот в мембранах опухолевых клеток, однако этот эффект остается в пределах статистической погрешности. Изменения соотношения насыщенных/мононенасыщенных жирных кислот были в основном связаны с изменением сигнала олеиновой кислоты. Полиненасыщенные жирные кислоты также демонстрировали сходное динамическое снижение после 24 ч инкубации с цисплатином (рис. 41).

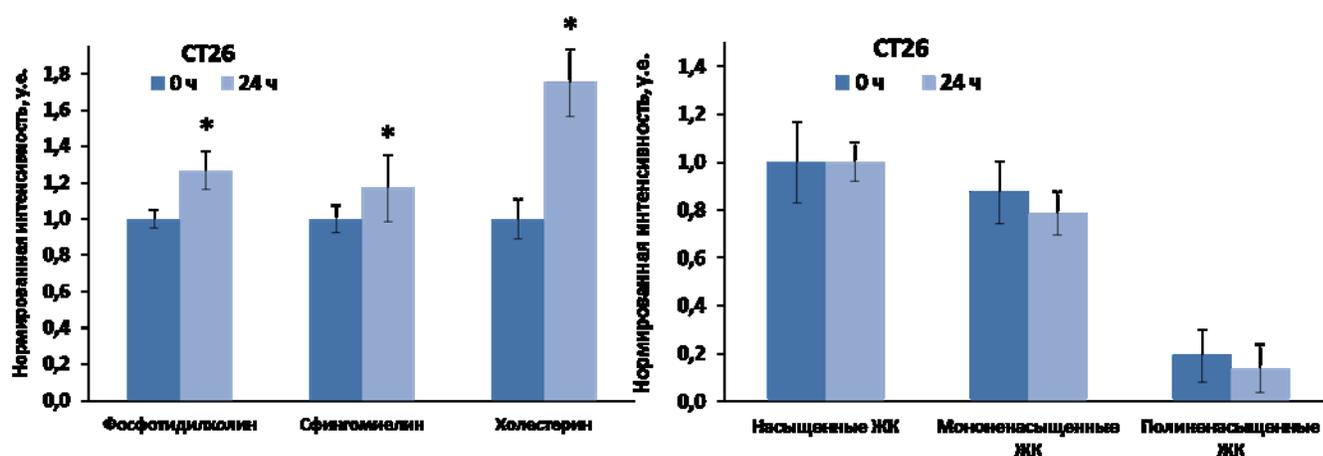


Рисунок 41. Масс-спектрометрический анализ мембран СТ26 клеток до (контроль) и после 24 ч инкубации с цисплатином. Сигнал фосфатидилхолина, сфингомиелина и холестерина, сигналы нормализован от контроля. *, $p < 0,0001$ по сравнению со своим контролем без воздействия.

Методом масс-спектрометрии было показано, что липидный профиль мембран клеток НСТ116 и НСТ116-OXAR 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. Показано, что при инкубации клеток НСТ116 с оксалиплатином в течение 24 ч в мембранах снижается содержание фосфатидилхолина на 25%,

мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот на 10%, в то время как сигнал холестерина увеличивается на 60% (рис. 42).

Важно отметить, что липидный профиль мембран резистентных клеток практически не изменился (рис. 42).

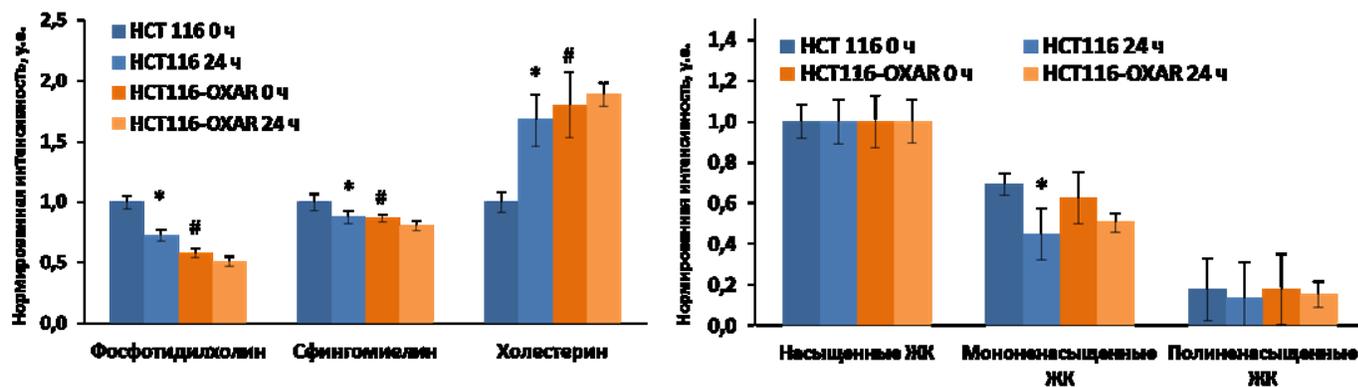


Рисунок 42. Масс-спектрометрический анализ мембран чувствительных НСТ116 клеток и резистентных к оксалиплатину НСТ116-OXAR клеток до (контроль) и в течение 24 ч воздействия оксалиплатина. Сигнал фосфотидилхолина, сфингомиелина и холестерина. Сигнал нормализован сигнал от контроля. *, $p < 0,0001$ по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

Полученные результаты объясняют зарегистрированное повышение вязкости 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.

Следует отметить, что опубликованные литературные данные о микровязкости раковых клеток довольно противоречивы, вероятно, из-за того, что измерения проводились «в объеме» и отражают усредненную вязкость по различным частям клеток или тканей. Первые попытки оценить вязкость рака были сделаны Guyer с соавт. с помощью метода центрифугирования суспензий клеток [5-6].

Недостаток этого метода заключался в том, что невозможно было дифференцировать вязкость отдельных компартментов клетки.

Микроскопическая вязкость отдельных доменов живых клеток *in vitro* была определена с использованием методов, основанных на флуоресценции, включая молекулярные ротаторы. Несмотря на то, что роторные свойства продемонстрированы у целого ряда соединений, например, DMABN, DPH, Тиофлавин Т, RCD, FCVJ, DCVJ и CCVJ, RY3, BODIPY, только некоторые из них, в частности BODIPY 2, нашли биологическое применение для измерения вязкости тех или иных компартментов клеток. Применительно к опухолевым клеткам были использованы только ротаторы на основе BODIPY [13, 17]. С помощью ротора BODIPY-C12 группой ученых под руководством М. Куимовой была впервые измерена вязкость внутриклеточных мембран живых раковых клеток SK-OV-3, которая составила от 170 до 180 сП [13]. С помощью BODIPY 2 была измерена вязкость внутриклеточных органелл, которая составила около 200 сП, и цитоплазматической мембраны клеток SK-OV-3, которая составила 270 сП [17].

В результате выполнения работы было показано, что микровязкость плазматической мембраны раковых клеток находится в диапазоне ~ 330-500 сП и различается для разных линий раковых клеток. Этот результат хорошо соответствует с данными, полученными в работах других авторов с применением флуоресцентных молекулярных ротаторов [13, 17].

Насколько известно по литературным данным, исследование микровязкости мембран клеток опухолевого сфероиды в процессе его естественного роста и при лечении цисплатином выполнено впервые в мире. Полученные данные при естественном росте опухолевого сфероиды свидетельствуют о том, что микровязкость мембран является стабильным биофизическим показателем клетки, вовлеченным в поддержание ее гомеостаза и нормального функционирования. Зарегистрированное повышение микровязкости мембран клеток опухолевого

сфероида HeLa Kyoto соответствуют изменениям, зарегистрированным для клеток монослоя той же клеточной линии.

Стоит подчеркнуть, что измерение микровязкости клеток опухолей *in vivo* было осуществлено впервые. Применение флуоресцентных молекулярных роторов в медико-биологических исследованиях диктует задачу их сольбилизации в водных средах. Особенно остро эта проблема стоит для исследований на животных. Низкая водорастворимость вещества делает невозможным его системное введение в организм. Для измерения микровязкости в опухолевой ткани *in vivo* использование водорастворимого молекулярного ротора BODIPY 2 не требует создания сольбилизованных форм. Неоспоримым достоинством флуоресцентного молекулярного ротора BODIPY 2 является то, что он водорастворим и имеет достаточно высокую интенсивность флуоресценции. Однако его недостатком является очень сложный, долгий и дорогостоящий химический синтез.

В данной работе впервые были получены данные о микровязкости опухолевых клеток *in vivo*. Используемый метод является новым, менее инвазивным, а измеряемое время жизни флуоресценции не зависит ни от концентрации вещества, ни от интенсивности возбуждающего света. Предложенный подход позволяет получить количественное определение вязкости, динамическое построение изображений в реальном времени и хорошее пространственное разрешение в условиях *in vivo*. Была определена микроскопическая вязкость в отдельных опухолевых клетках *in vivo* и наблюдаемые значения близки к значениям, полученным *in vitro* для той же линии опухолевых клеток.

Несмотря на фундаментальное значение микровязкости для клеточной биологии и физиологии, ее роль в патогенезе рака и реакции на терапию до конца не изучена. Химиотерапия - одно из основных средств лечения злокачественных новообразований. Однако физиологические процессы, происходящие при действии химиотерапевтического агента на живую клетку, полностью не описаны. В

частности, влияние препаратов на основе платины на вязкость клеток изучено очень плохо.

Связь между вязкостью мембраны и реакцией клеток на химиотерапию включает несколько аспектов. Прежде всего, мембрана - это физический барьер для проникновения терапевтических агентов в клетку. Более высокая вязкость снижает диффузию лекарственного средства через мембрану и считается одним из механизмов химиорезистентности. Во-вторых, микровязкость мембраны вносит вклад в скорость оттока лекарств из клетки, таких как Р-гликопротеин, который выводит многие терапевтические соединения из клетки и способствует множественной лекарственной устойчивости. Наконец, снижение вязкости плазматической мембраны способствует индукции апоптоза, опосредованного рецептором смерти Fas.

Недавние исследования показали, что ответ опухоли на цисплатин определяется не только взаимодействием препарата с первичной мишенью (ядерной ДНК), но также может включать множественные физиологические и физико-химические изменения. Независимые авторы продемонстрировали, что лечение цисплатином быстро увеличивает текучесть в липидных рафтах мембран в клетках колоректального рака HT29 между 15 мин и 4 часами после лечения [8, 78, 86]. По их результатам было сделано предположение, что активация сфингомиелиназы является главным механизмом уменьшения микровязкости мембран. Кроме того известно, что некоторые другие апоптотические стимулы, в том числе химиотерапевтические агенты, вызывают образование церамида, который быстро формирует домены (рафты) внутри плазматической мембраны и способствует кластеризации рецепторов смерти [86].

В представленном исследовании было зарегистрировано небольшое статистически незначимое снижение вязкости мембраны в ранние сроки после лечения клеток цисплатином, которое было воспроизводимым в обеих исследованных клеточных линиях - СТ26 и HeLa Kyoto. Такое кратковременное

снижение вязкости согласуется с литературными данными, описанными выше. Полученный результат незначительного разжижения мембран согласуется с отсутствием обширного апоптоза в этих клеточных культурах в этот момент времени в виду малых концентраций препарата, в то время как в работах других авторов использовались высокие концентрации, достигающие 30 μM . Также, ранее было показано, что цисплатин в концентрации от 2.4 до 2.6 μM влияет на пролиферативную способность, а не на жизнеспособность раковых клеток HeLa — количество погибших клеток не превышало 10%, тогда как рост клеток подавлялся после 24-часового воздействия цисплатина [134].

Несколько исследований указывают на связь изменения биофизических свойств клеточных мембран и резистентностью раковых клеток к препаратам платины. Например, Huang с соавт. зарегистрировали повышенную микровязкость плазматических мембран цисплатин-резистентных клеток легочной аденокарциномы человека A549/DDP по сравнению с чувствительными клетками A549, что, вероятно, связано с более плотной упаковкой фосфолипидов и снижением степени ненасыщенности жирных кислот [11]. Также было обнаружено, что формирование устойчивости к цисплатину у опухолевых клеток рака молочной железы человека MCF-7 сопровождается изменениями в составе липидов, в частности увеличением содержания холестерина и эфиров холестерина, снижением количества моноацилглицеринов и триацилглицеринов, повышением содержания сфингомиелина и фосфатидилсерина, а также пониженное содержание фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, что свидетельствует об увеличении вязкости [96]. Кроме того, V. Cherhun с соавт. в своей работе обнаружил, что плазматическая мембрана клеток резистентной карциномы Генера обладает большей вязкостью по сравнению с чувствительной карциномой [10]. Низкое содержание холестерина приводит к неправильному формированию рафтов, нарушению функционирования молекул адгезии и, в конечном итоге, к метастазам [29]. Так,

например, миграция клеток меланомы регулируется изменениями липидных рафтов [72].

В клетках колоректального рака человека были обнаружены повышенные уровни всех фосфолипидов, включая фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин, что связано с усилением синтеза клеточной мембраны [135]. Аномальный биосинтез фосфатидилхолина, которому способствует связанный с липидными каплями фермент лизоРС-ацилтрансфераза 2 (LPCAT2), способствует устойчивости к оксалиплатину при колоректальном раке [136]. Таким образом, состав жирных ацильных цепей в мембранных фосфолипидах рассматривается как главный фактор дифференциации между чувствительными к лекарствам и устойчивыми к лекарствам клетками.

В работе при длительном воздействии оксалиплатина на клетки НСТ116, также продемонстрирована повышенная микровязкость мембран в клетках, адаптированных к оксалиплатину, но это наблюдалось только в диапазоне низких (0.5–2.0 мкМ) концентраций. При дальнейшем увеличении дозы препарата, т. е. лучшей адаптации клеток к препарату, не было зарегистрировано больших различий в микровязкости между резистентными и чувствительными клетками.

Важно отметить, что это согласуется с изменениями микровязкости клеток опухолей *in vivo* при лечении оксалиплатином: микровязкость резистентных опухолевых клеток, как леченых, так и нелеченых оксалиплатином, не отличалась от микровязкости клеток нерезистентных опухолей.

Кроме того, известно, что липиды участвуют в различных сигнальных процессах, поскольку они модулируют динамику функционирования мембранных рецепторов, контролируют работу рецепторов, а также могут выступать в качестве вторичных мессенджеров в путях передачи сигнала [82, 88, 137]. Предполагается, что все исследуемые в представленной работе компоненты липидного слоя мембран, а именно фосфатидилхолин, сфингомиелин, холестерин, ненасыщенные жирные кислоты, могут вносить вклад в сигнальные пути раковых клеток, которые

способствуют росту, выживанию и дальнейшему метастазированию. Следовательно, возможно, что изменения липидного состава, выявленные в резистентных клетках, представляют собой не только компенсаторную реакцию стабилизации микровязкости мембран, но играют важную роль в более сложных молекулярных каскадах, имеющих первостепенное значение для жизнедеятельности и нормального функционирования клетки. Таким образом, полученные результаты на культивируемых клетках, адаптированных к высокой дозе оксалиплатина, и на опухолях мышей позволяют предположить, что приобретение химиорезистентности сопровождается компенсаторной модификацией липидного состава мембран таким образом, что вязкостные свойства остаются неизменными при дальнейшем воздействии и, таким образом, обеспечивают выживание опухолевых клеток. Ремоделирование мембранных липидов имеет решающее значение для гомеостатического поддержания физических свойств мембраны и, следовательно, целостности клетки. Наши результаты впервые указывают на то, что химиотерапия платина-содержащими препаратами также провоцирует ремоделирование липидов при постепенной адаптации к препарату, что в свою очередь позволяет раковым клеткам противостоять цитотоксическим эффектам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени роль микровязкости мембран в патогенезе рака и реакции на терапию до конца не изучена, несмотря на фундаментальное значение этого параметра для клеточной биологии, физиологии и биофизики. В первую очередь это связано с отсутствием адекватных и точных методов измерения микровязкости. Однако, благодаря развитию флуоресцентных методов, в частности флуоресцентной микроскопии с временным разрешением FLIM, и появлению молекулярных роторов стало возможным не только измерить микровязкость мембран, но и визуализировать микровязкость мембран живых клеток в реальном времени. Данный подход является достаточно новым, и биологические исследования с применением флуоресцентных молекулярных роторов на сегодняшний день ограничены только несколькими работами *in vitro*, тогда как исследований *in vivo* не проводилось.

В данной диссертационной работе впервые было проведено комплексное исследование вязкостных свойств опухолевых клеток с использованием флуоресцентной микроскопии с временным разрешением и флуоресцентного молекулярного ротора в различных опухолевых моделях, а именно в монослойных клеточных культурах, сфероидах и опухолях животных *in vivo* при воздействии химиопрепаратов платинового ряда. С использованием адаптированных методик показано, что микровязкость плазматической мембраны является специфичной величиной для опухолевых клеток разного тканевого происхождения, и имеет схожие значения в условиях естественного роста *in vitro* и *in vivo*.

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*. Оценка изменения микровязкости мембран опухолевых клеток при воздействии цисплатином в монослойных клеточных культурах показала тенденцию к

понижению на ранних сроках инкубации с препаратом (10-60 мин), однако спустя 24 ч инкубации с цисплатином было зарегистрировано статистически значимое повышение вязкости мембран. Полученный результат универсален и характерен для исследуемых клеточных линий. При исследовании микровязкости плазматических мембран в живых клетках опухолевого сфероида было показано, что микровязкость плазматических мембран в клетках сфероида не различается для сфероидов разного размера, и между внутренним и внешним клеточными слоями сфероида. Полученные данные указывают на стабильность микровязкости мембраны и независимость от метаболической активности клеток и/или неоднородности клеточного микроокружения. Однако, при действии цисплатиноа в течение 24-48 ч, также как и на клетках монослоя, было зарегистрировано значительное повышение микровязкости мембран. Полученные результаты позволяют предположить, что увеличение микровязкости мембраны может быть ранним адаптивным ответом на стрессовые условия (например, повреждение ДНК), частью механизмов ответа клетки на химиотерапию. В результате работы продемонстрирована применимость данного подхода измерения микровязкости мембран опухолевых клеток для определения опухолевого ответа на химиотерапию.

Впервые при помощи метода FLIM в сочетании с флуоресцентным молекулярным ротором были получены данные об изменении микровязкости мембран опухолевых клеток при индукции резистентности к оксалиплатину. При адаптации к минимальным дозам препарата было зарегистрировано достоверное увеличение вязкости мембран, однако при достижении резистентности микровязкость мембран снижалась до контрольных значений. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что увеличение микровязкости мембраны под действием оксалиплатина может быть связано с адаптацией клеток к стрессовым условиям, тогда как последующий возврат к исходному значению, вероятно, означает, что клетки приобрели свойство резистентности к оксалиплатину на биохимическом и биофизическом уровнях.

Впервые в результате измерения микровязкости в опухолях *in vivo* было продемонстрировано, что микровязкость клеток чувствительной и резистентной опухолей была одинаковой. Как и в модели *in vitro*, в резистентных опухолях микровязкость не изменилась после воздействия оксалиплатином, в то же время для клеток, чувствительных к оксалиплатину опухолей, было показано увеличение микровязкости, что хорошо коррелирует с данными, полученными для *in vitro*.

Известно, что микровязкость биологических мембран во многом обусловлена качественным и количественным липидным составом. Поэтому в настоящей работе с использованием метода масс-спектрометрии 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.

Результаты работы указывают на возможность прижизненного исследования микровязкости мембран опухолевых клеток при химиотерапии в динамике на микроскопическом уровне. Полученные данные расширяют понимание механизмов ответа опухоли на лечение и механизмов действия химиопрепаратов на основе платины, 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 и при разработке новых видов противоопухолевого лечения и усовершенствования уже существующих протоколов. Прикладным аспектом в перспективе является разработка методов оценки эффективности противоопухолевой терапии и для перехода к персонализированной медицине.

ВЫВОДЫ

1. С использованием адаптированных методик проведена визуализация микровязкости в монослойных клеточных культурах НСТ116, 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 сфероида 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 HCT116-OXAR отличается от чувствительного аналога и не меняется при воздействии оксалиплатином.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иваницкий Г. Р. Математическая биофизика клетки. М., «Наука», 1978, С. 308.
2. Swaminathan R., Cathy P. Photobleaching Recovery and Anisotropy Decay of Green Fluorescent Protein GFP-S65T in Solution and Cells: Cytoplasmic Viscosity Probed by Green Fluorescent Protein Translational and Rotational Diffusion . *Biophysical Journal*, Vol. 72, 1997. PP. 1900-1907.
3. Sutharsan J., Lichlyter D., Wright N. Molecular rotors: synthesis and evaluation as viscosity sensors . *Tetrahedron*, 66, 2010, 2582–2588.
4. Nativ O., Shinitzky M., Manu H., Hecht D., Roberts C. T., LeRoith D. and Zick Y. Elevated protein tyrosine phosphatase activity and increased membrane viscosity are associated with impaired activation of the insulin receptor kinase in old rats . *Biochem. J.*, 298 (Part 2), 1994, 443-450/
5. Guyer M. V. Increased Viscosity of Cells of Induced Tumors . *Cancer Res*, 2, 1942, PP. 16-18.
6. Guyer M. V. . Relative viscosities of tumor cells as determined by the ultracentrifuge . *The anatomical record*, Vol 73 № 1, 1947, PP. 17-27.
7. Halpern S. Diminished Aqueous Microviscosity of Tumors. *Cancer Research* 59, 1999, 5836 –5841.
8. Rebillard, A.; Tekpli, X.; Meurette, O.; Sergent, O.; LeMoigne-Muller, G.; Vernhet, L.; Gorria, M.; Chevanne, M.; Christmann, M.; Kaina, B.; et al. Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2007, 67, 7865–7874.
9. Kuimova M. K., Botchway S. W., Parker A. W. Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death . *Nat. Chem.* 1, 2009, PP. 69-73.
10. Cherhun V. Structural alterations of plasma membranes of Guerin's carcinoma cells upon the development of resistance to doxorubicine. *Exp. Oncology* 24, 2002, PP. 279-283.

11. Huang Z. NMR studies of the relationship between the changes of membrane lipids and the cisplatin-resistance of A549/DDP cells . *Cancer Cell International*, 2003, 3:5.
12. Wu Y., S'tefl M., Olzyn'ska A. Molecular rheometry: direct determination of viscosity in Loand Ldlipid phases via fluorescence lifetime imaging . *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, 15, PP. 14986 – 14993.
13. Kuimova M. K.. Mapping viscosity in cells using molecular rotors . *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14, 2012, PP. 12671–12686.
14. López-Duarte, I., Vu, T. T., Izquierdo, M. A., Bull, J. A., and Kuimova, M. K. A/ molecular rotor for measuring viscosity in plasma membranes of live cells. *Chemical Communications*, 2014, 50(40), 5282-5284.
15. Nipper M., Majd Sh. Characterization of changes in the viscosity of lipid membranes with the molecular rotor FCVJ . *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, 2008. PP. 1148–1153.
16. Hosny N.A., Song M., Connelly J.T., Ameer-Beg S., Knight M.M., et al. Correction: Super-Resolution Imaging Strategies for Cell Biologists Using a Spinning Disk Microscope. *PLOS one*, 2013, 8(12): 10.
17. Kuimova M. K., Vu T. T., Izquierdo M. A. A molecular rotor for measuring viscosity in plasma membranes of live cells . *Chem. Commun.*, 2014, 40.
18. Fushimi K. and Verkman A. S. Low Viscosity in the Aqueous Domain of Cell Cytoplasm Measured by Picosecond Polarization Microfluofimetry . *The Journal of Cell Biology*, Vol. 112, No. 4, 1991, PP. 719-725.
19. Владимиров Ю. А., Рощупкин Д. И., Потапенко А. Я., Деев А. И. Биофизика. Под ред. Ю. А. Владимирова. - М. : Медицина, 1983. - 272 с.
20. Lipowsky R., Sackmann E. Structure and dynamics of membranes: I. from cells to vesicles/II. generic and specific interactions. – Elsevier, 1995.
21. Зайко Н. Н., Быць Ю. В., Атаман А. В. и др. Патологическая физиология. Учебник для студентов медицинских вузов. – К.: Логос, 1996.

22. Peng X., Yang Z.. Fluorescence Ratiometry and Fluorescence Lifetime Imaging: Using a Single Molecular Sensor for Dual Mode Imaging of Cellular Viscosity . J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 6626–6635.
23. Renner M., Choquet D. and Triller A. Control of the Postsynaptic Membrane Viscosity . The Journal of Neuroscience, March 4, 2009. 29, PP. 2926 –2937.
24. Gracià, R. S., Bezlyepkina, N., Knorr, R. L., Lipowsky, R., & Dimova, R. (2010). Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles. *Soft Matter*, 6(7), 1472.
25. Kakorin S, Brinkmann U, Neumann E. Cholesterol reduces membrane electroporation and electric deformation of small bilayer vesicles. *Biophys. Chem.* 2005. 117(2):155–171.
26. Кучеренко Н.Е., Васильев А.Н. Липиды. Вища шк., 1985, 247 с.
27. Hoejholt K.L., Mužić T., Jensen S.D., Dalgaard L.T., Bilgin M, Nylandsted J et al Calcium electroporation and electrochemotherapy for cancer treatment: Importance of cell membrane composition investigated by lipidomics, calorimetry and in vitro efficacy. *Sci. Rep.* 2019. 9(1).
28. Pradas, I., Huynh, K., Cabré, R., Ayala, V., Meikle, P. J., Jové, M., & Pamplona, R.. Lipidomics reveals a tissue-specific fingerprint. *Front. Physiol.*, 2018; 9: 1165.
29. Buschiazzo J, Ialy-Radio C, Auer J, Wolf JP, Serres C, Lefèvre B, Ziyyat A. Cholesterol Depletion Disorganizes Oocyte Membrane Rafts Altering Mouse Fertilization. *PLoS One.* 2013, 8(4).
30. Laat S. D. Microviscosity modulation during the cell cycle of neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 74, No. 10, 1977. PP. 4458-4461.
31. Llado, V., Teres, S., Higuera, M., Alvarez, R., Noguera-Salva, M. A., Halver, J. E., et al. Busquets, X. Pivotal role of dihydrofolate reductase knockdown in the anticancer activity of 2-hydroxyoleic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(33), 13754–13758.

32. Haidekker M. A., L'Heureux N. Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: a study with DCVJ fluorescence . *Physiol.: Heart Circ. Physiol.*, 2000, 278, PP. 1401–1406.
33. Rebelo L.M., de Sousa J.S., Mendes Filho J., Radmacher M. Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy . *Nanotechnology*. 24(5), 2013, 055102.
34. Doblaz S. Magnetic resonance elastography measurements of viscosity: a novel biomarker for human hepatic tumor malignancy . *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 19, 2011. P. 389.
35. Ketene A.N., Schmelz E.M., Roberts P.C., Agah M. The effects of cancer progression on the viscoelasticity of ovarian cell cytoskeleton structures . *Nanomedicine*. 8(1), 2012, 93-102.
36. Sok M., Šentjerc M., Schara M. Membrane fluidity characteristics of human lung cancer. *Cancer Lett* 1999;139:215–20.
37. Sok M., et al. Cell membrane fluidity and prognosis of lung cancer *Ann. Thorac. Surg.*, 73. 2002, pp. 1567-1571.
38. Deliconstantinos G., Villiotou V. and Stavrides J.C. Modulation of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in cholesterol enriched endothelial cell membranes . *Biochem. Pharmacol.*, 49, 1995, p. 1589.
39. Nakazawa I., Iwaizumi M. A role of the cancer cell membrane fluidity in the cancer metastases: an ESR study. *Tohoku J. Exp. Med.*, 157. 1989, pp. 193-198.
40. Daefler S, Krueger GR, Modder B, Deliconstantinos G. Cell membrane fluidity in chronic lymphocytic leukemia (CLL) lymphocytes and its relation to membrane receptor expression. *J Exp Pathol*. 1987;3:147–54.
41. Iwagaki H, Marutaka M, Nezu M, Suguri T, Tanaka N, Orita K. Cell membrane fluidity in K562 cells and its relation to receptor expression. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1994;85:141–9.

42. Taraboletti G, Perin L, Bottazzi B, Mantovani A, Giavazzi R, Salmona M. Membrane fluidity affects tumor cell motility, invasion and lung colonizing potential. *Int J Cancer*. 1989;44:707–13/
43. Inbar M. Fluidity of membrane lipids: a single cell analysis of mouse normal lymphocytes and malignant lymphoma cells. *FEBS Lett*. 1976;67:180–5.
44. Hattori T, Andoh T, Sakai N, et al. Membrane phospholipid composition and membrane fluidity of human brain tumour: a spin label study. *Neurol Res*. 1987;9:38–43.
45. Sherbet GV. Membrane fluidity and cancer metastasis. *Exp Cell Biol*. 1989;57:198–205.
46. Campanella R. Membrane lipids modifications in human gliomas of different degree of malignancy. *J. Neurosurg. Sci.*, 36. 1992, pp. 11-25.
47. Galeotti T., Borrello S., Minotti G., Masotti L. Membrane alterations in cancer cells: the role of oxy radicals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 488. 1986, pp. 468-480.
48. Bernardes N, Fialho AM. Perturbing the dynamics and organization of cell membrane components: A new paradigm for cancer-targeted therapies. *Int. J. Mol. Sci. MDPI AG*. 2018.
49. Casares D, Escribá PV, Rosselló CA. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int. J. Mol. Sci*. 2019. 20(9):2167.
50. Pakiet A, Kobiela J, Stepnowski P, Sledzinski T, Mika A. Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: A review. *Lipids Health Dis. BioMed Central Ltd*. 2019.
51. Perrotti F, Rosa C, Cicalini I, Sacchetta P, Del Boccio P, Genovesi D, Pieragostino D. Advances in lipidomics for cancer biomarkers discovery. *Int. J. Mol. Sci. MDPI AG*. 2016.
52. Zalba, S., & ten Hagen, T. L. M. Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treat Rev*, 2017, 52:48-57.

53. Rivel T, Ramseyer C, Yesylevskyy S. The asymmetry of plasma membranes and their cholesterol content influence the uptake of cisplatin. *Sci. Rep.* 2019. 9(1):1–14.
54. Hu L, Wang RY, Cai J, Feng D, Yang GZ, Xu QG et al. Overexpression of CHKA contributes to tumor progression and metastasis and predicts poor prognosis in colorectal carcinoma. *Oncotarget.* 2016. 7(41):66660–66678.
55. Arlauckas, S. P., Popov, A. V., & Delikatny, E. J. Choline kinase alpha - Putting the ChoK-hold on tumor metabolism. *Prog. Lipid Res.* Elsevier Ltd. *Prog Lipid Res*, 2016, 63:28-40.
56. Sola-Leyva A, López-Cara LC, Ríos-Marco P, Ríos A, Marco C, Carrasco-Jiménez MP. Choline kinase inhibitors EB-3D and EB-3P interferes with lipid homeostasis in HepG2 cells. *Sci. Rep.* 2019. 9(1):1–13.
57. Podo, F., Paris, L., Cecchetti, S., Spadaro, F., Abalsamo, L., Ramoni, C., Iorio, E. Activation of phosphatidylcholinespecific phospholipase C in breast and ovarian cancer: Impact on mrs-detected choline metabolic profile and perspectives for targeted therapy. *Front. Oncol.*, 2016, 6, 171.
58. Modok S, Heyward C, Callaghan R. P-glycoprotein retains function when reconstituted into a sphingolipid- and cholesterol-rich environment. *J. Lipid Res.* 2004. 45(10):1910–1918.
59. Slotte J.P., Ramstedt B. The functional role of sphingomyelin in cell membranes. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2007, 109:977–981.
60. Zheng K, Chen Z, Feng H, Chen Y, Zhang C, Yu J et al. Sphingomyelin synthase 2 promotes an aggressive breast cancer phenotype by disrupting the homeostasis of ceramide and sphingomyelin. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3).
61. Woodcock J. Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis. *IUBMB Life*, 2006, 58(8), 462–466.
62. Ehmsen S, Pedersen MH, Wang G, Terp MG, Arslanagic A, Hood BL et al. Increased Cholesterol Biosynthesis Is a Key Characteristic of Breast Cancer Stem Cells Influencing Patient Outcome. *Cell Rep.*, 2019, 27(13), 3927–3938.e6.

63. Yang F, Chen GX. Production of extracellular lysophosphatidic acid in the regulation of adipocyte functions and liver fibrosis. *World J. Gastroenterol.*, 2018, 24(36), 4132–4151.
64. Zhao Z., Hao D., Wang L., Li J., Meng Y., Li P. et al. CtBP promotes metastasis of breast cancer through repressing cholesterol and activating TGF- β signaling. *Oncogene*, 2019, 38(12), 2076–2091.
65. Alves, A. C., Ribeiro, D., Nunes, C., & Reis, S. Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* Elsevier B.V., 2016, 1858(9), 2231-2244.
66. Peetla C., Vijayaraghavalu S., Labhasetwar V. Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev. NIH Public Access.*, 2013, 65(13-14), 1686-1698.
67. Hendrich A.B., Michalak K. Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells. *Curr. Drug Targets*, 2003, 4, 23-30.
68. Cohen, A. W., Hnasko, R., Schubert, W., & Lisanti, M. P. Role of Caveolae and Caveolins in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 2004, 84(4), 1341–1379.
69. Hryniewicz-Jankowska, A., Augoff, K., Biernatowska, A., Podkalicka, J., & Sikorski, A. F. Membrane rafts as a novel target in cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 2014, 1845(2), 155–165.
70. Head B.P., Patel H.H., Insel P.A. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1838(2), 532–45.
71. Niero, E., Rocha-Sales, B., Lauand, C., Cortez, B., de Souza, M., Rezende-Teixeira, P., et al. The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2014, 33(1), 37.
72. Wang L., Xiao Y. and Deng L. Activatable Rotor for Quantifying Lysosomal Viscosity in Living Cells . *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 2903-2906.

73. Li J., Condello S., Thomes-Pepin J., Ma X., Xia Y., Hurley T.D. et al. Lipid Desaturation Is a Metabolic Marker and Therapeutic Target of Ovarian Cancer Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(3):303–314.e5.
74. Mason P, Liang B, Li L, Fremgen T, Murphy E, Quinn A et al. SCD1 inhibition causes cancer cell death by depleting mono-unsaturated fatty acids. *PLoS One*. 2012. 7(3):e33823.
75. Peck B, Schug ZT, Zhang Q, Dankworth B, Jones DT, Smethurst E et al. Inhibition of fatty acid desaturation is detrimental to cancer cell survival in metabolically compromised environments. *Cancer Metab*. 2016. 4(1):6.
76. Beloribi-Djefafli S, Vasseur S, Guillaumond F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*, 2016, 5(1):e189–e189.
77. Seydel J.K., Wiese M. Drug-membrane interactions: analysis. *Drug Distribution, Modeling, Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Volume 15 By J. K. Seydel and M. Wiese. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 2002, 349 pp.
78. Lacour, S.; Hammann, A.; Grazide, S.; Lagadic-Gossmann, D.; Athias, A.; Sergent, O.; Laurent, G.; Gambert, P.; Solary, E.; Dimanche-Boitrel, M.-T. Cisplatin-Induced CD95 Redistribution into Membrane Lipid Rafts of HT29 Human Colon Cancer Cells. *Cancer Res*. 2004, 64, 3593–3598.
79. Speelmans, G.; Sips WH, H.M.; Grisel RJ, H.; Staffhorst RW, H.M.; Fichtinger-Schepman AM, J.; Reedijk, J.; de Kruijff, B. The interaction of the anti-cancer drug cisplatin with phospholipids is specific for negatively charged phospholipids and takes place at low chloride ion concentration. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr*. 1996, 1283, 60–66.
80. Suwalsky M., Hernández P., Villenab F., Sotomayorc C. P. The anticancer drug cisplatin interacts with the human erythrocyte membrane. *Z. Naturforsch C*. 2000, 55, 461–466.

81. Ramachandran, S., Quist, A. P., Kumar, S., and Lal, R. (2006). Cisplatin nanoliposomes for cancer therapy: AFM and fluorescence imaging of cisplatin encapsulation, stability, cellular uptake, and toxicity. *Langmuir* 22, 8156–8162.
82. Shen Z.-W., Sun Z.-P., Zhao N.-M. (1991). Study of the effects of the antitumor drug cis-DPP on the phase behavior of DPPC liposomes and molecular mechanism of the interaction. *Chin. Sci. Bull.* 36 149–153.
83. Peleg-shulman T., Gibson D., Cohen R., Abra R. Characterization of sterically stabilized cisplatin liposomes by nuclear magnetic resonance. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. 1510. P. 278–291.
84. Wang K., Lu J., Li R. (1996). The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coord. Chem. Rev.* 151 53–88.
85. Baritaki, S., Apostolakis, S., Kanellou, P., Dimanche- Boitrel, M., Spandidos, D. A., & Bonavida, B. Reversal of Tumor Resistance to Apoptotic Stimuli by Alteration of Membrane Fluidity: Therapeutic Implications. *Advances in Cancer Research*, 2007, 98, 149–190.
86. Rebillard A., Jouan-Lanhouet S., Jouan E., Legembre P., Pizon M., Sergent O., et al. Cisplatin-induced apoptosis involves a Fas-ROCK-ezrin-dependent actin remodelling in human colon cancer cells. *Eur. J. Cancer.* 2010. 46. P. 1445–1455.
87. Siddik Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22 7265–7279.
88. Galluzzi L., Vitale I., Michels J., Brenner C., Szabadkai G., Harel-Bellan A., et al. (2014). Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* 5:e1257.
89. Martinho, N.; Santos TC, B.; Florindo, H.F.; Silva, L.C. Cisplatin-Membrane Interactions and Their Influence on Platinum Complexes Activity and Toxicity. *Front. Physiol.* 2018, 9, 1898.
90. Sharma S., Santiskulvong C., Bentolila L. A., Rao J., Dorigo O., Gimzewski J. K. Correlative nanomechanical profiling with super-resolution F-actin imaging reveals

- novel insights into mechanisms of cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Nanomedicine*. 2012. 8. P. 757–766.
91. Sharma S., Santiskulvong C., Rao J., Gimzewski J. K., Dorigo O. The role of Rho GTPase in cell stiffness and cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Integr. Biol.* 2014. 6. P. 611–617.
92. Liang, X.; Huang, Y. Physical state changes of membrane lipids in human lung adenocarcinoma A(549) cells and their resistance to cisplatin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002, 34, 1248–1255.
93. Liang, X.-J.; Yin, J.-J.; Zhou, J.-W.; Wang, P.C.; Taylor, B.; Cardarelli, C.; Kozar, M.; Forte, R.; Aszalos, A.; Gottesman, M.M. Changes in biophysical parameters of plasma membranes influence cisplatin resistance of sensitive and resistant epidermal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 2004, 293, 283–291.
94. Pinto, S. N., Silva, L. C., Futerman, A. H., & Prieto, M. (2011). Effect of ceramide structure on membrane biophysical properties: The role of acyl chain length and unsaturation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(11), 2753–2760.
95. Dimanche-Boitrel M. T., Pelletier H., Genne P., Petit J. M., Le Grimellec C., Canal P., et al. (1992). Confluence-dependent resistance in human colon cancer cells: role of reduced drug accumulation and low intrinsic chemosensitivity of resting cells. *Int. J. cancer* 50 677–682.
96. Todor I. N., Lukianova N. Y. and Chekhun V. F., The lipid content of cisplatin- and doxorubicin-resistant MCF-7 human breast cancer cells, *Exp. Oncol.*, 2012. 34 (2), 97 – 100.
97. Boutin C., Roche Y., Millot C., Deturche R., Royer P., Manfait M., Plain J.M., Jeannesson P., Millot J.M., Jaffiol R. High heterogeneity of plasma membrane microfluidity in multidrug-resistant cancer cells. *J. Biomed. Opt.* 14(3), 2009, 034030.
98. Maurmann L., Belkacemi L., Adams N. R., Majmudar P. M., Moghaddas S., Bose R. N. A novel cisplatin mediated apoptosis pathway is associated with acid sphingomyelinase

- and FAS proapoptotic protein activation in ovarian cancer. *Apoptosis*. 2015. 20. P. 960–974.
99. Haidekker M. A., Brady T.P. Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes . *Bioorganic Chemistry*, 33, 2005. PP. 415–425.
100. Иванов Л.В. Оценка микровязкости клеточных мембран различной природы методом спиновых зондов. ISSN 2012, PP 1025-6415.
101. Грищенко В.И., Межидов С.Х., Моисеев В.А., Нардид О.А. Влияние температуры и концентрации различных веществ на микровязкость цитозоля эритроцитов. *Биофизика*. 1995. №1. С. 106-109.
102. Festy F., Ameer-Beg S. M., Suhling K. Imaging proteins in vivo using fluorescence lifetime microscopy, *Mol. Biosyst.* 3, 2007, 381-391.
103. Lakowicz J. R. Fluorescence anisotropy //Principles of fluorescence spectroscopy. – Springer, Boston, MA, 1999. С. 291-319.
104. Steiner, R. F. (n.d.). Fluorescence Anisotropy: Theory and Applications. *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, 1–52.
105. Rayan G, Guet JE, Taulier N et al. Recent applications of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to membrane bio-macromolecules. *Sensors (Basel)*. 2010, 10, 6, 5927-48.
106. González-González IM, Jaskolski F, Goldberg Y et al. Measuring membrane protein dynamics in neurons using fluorescence recovery after photobleach. *Methods Enzymol.*, 2012, 504, 127-46.
107. Suhling, K., Siegel, J., Lanigan, P. M. P., Lévêque-Fort, S., Webb, S. E. D., Phillips, D., et al. Time-resolved fluorescence anisotropy imaging applied to live cells. *Optics Letters*, 2004, 29(6), 584.
108. Haidekker M. A., Theodorakis E. A. Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors . *Journal of Biological Engineering* 2010, 4:11.

109. Abdel-Mottaleb M. S. A., R. O. Loutfy and R. Lapouyade, *Photochem. Photobiol.*, 1989, 48, 87–93.
110. Rotkiewicz K., Grellmann K. H. and Grabowski Z. R.. Reinterpretation of the anomalous fluorescence of p-n,n-dimethylamino-benzonitrile *Chem. Phys. Lett.*, 1973, 19, 315–318.
111. Kuimova M. K., Yahioğlu G., Levitt J. A. Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging . *J. Am. Chem. Soc.* 130, 2008, 6672-6673.
112. Levitt J. A., Kuimova M. K., Yahioğlu G. Membrane-bound molecular rotors measure viscosity in live cells via fluorescence lifetime imaging . *J. Phys. Chem. C* 113, 2009, 11634-11642.
113. Alamiry M., Benniston A. A Molecular Rotor Based on an Unhindered Boron Dipyrromethene (Bodipy) Dye. *Chem. Mater.* 2008, 20, 4024–4032.
114. Yang Z., He Y., Lee J.-H., Park N., Suh M., Chae W.-S., Cao J., Peng X., Jung H., Kang C., et al. A self-calibrating bipartite viscosity sensor for mitochondria. *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 2013, 9181–9185.
115. Gatzogiannis E., Chen Z., Wei L., Wombacher R., Kao Y.-T., Yefremov G., Cornish V. W., Min W. Mapping protein-specific micro-environments in live cells by fluorescence lifetime imaging of a hybrid genetic-chemical molecular rotor tag . *Chem. Commun.* 48, 2012, 8694–8696.
116. Kwok W. M., Ma C. A Determination of the Structure of the Intramolecular Charge Transfer State of 4-Dimethylaminobenzonitrile (DMABN) by Time-Resolved Resonance Raman Spectroscopy . *J. Phys. Chem. A*, 2001, 105, 984-990.
117. Petitou M. Decreased microviscosity of membrane lipids in leukemic cells . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 75, No. 5, 1978, 2306-2310.
118. Stsiapura V. and Maskevich A. Thioflavin T as a Molecular Rotor: Fluorescent Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Viscosity . *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, 15893–15902.

119. Zhu L-L., Li X.. Photolockable Ratiometric Viscosity Sensitivity of Cyclodextrin Polypseudorotaxane with Light-Active Rotor Graft . *Langmuir* 2009, 25, 3482-3486.
120. Kung C. and Reed J. Fluorescent Molecular Rotors: A New Class of Probes for Tubulin Structure and Assembly . *Biochemistry* 1989, 28, 6678-6686.
121. Dent M. R., Lopez Duarte I., Dickson C. J., Geoghegan N. D., Cooper J. M., Gould I. R., Krams R., Bull J. A., Brooks N. J., Kuimova M. K. Imaging phase separation in model lipid membranes through the use of BODIPY based molecular rotors . *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 2015, 18393–18402.
122. Vyšniauskas A., Qurashi M., Kuimova M. K. Molecular rotor measures dynamic changes of lipid bilayer viscosity caused by oxidative stress . *Chem. Eur. J.*, 22(37), 2016, 13210-13217.
123. Vyšniauskas A., Qurashi M., Gallop N., Balaz M., Anderson H. L. and Kuimova M. K. Unraveling the effect of temperature on viscosity-sensitive fluorescent molecular rotors . *Chem. Sci.*, 6, 2015, 5773-5778.
124. Becker W. Fluorescence lifetime imaging – techniques and applications. *Journal of Microscopy*, Vol. 247, Pt. 2, 2012, 119–136.
125. Borst J. W. et al. Fluorescence lifetime imaging microscopy in life sciences. IOP Publishing, *Meas. Sci. Technol.* No. 21, 2010, 21.
126. Ishikawa-Ankerhold, H. C., Ankerhold, R., Drummen, G. P. C. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*, 2012, 17(4), 4047–4132.
127. Oida, T.; Sako, Y.; Kusumi, A. Fluorescence lifetime imaging microscopy (flimscopy). Methodology development and application to studies of endosome fusion in single cells. *Biophys. J.* 1993, 64, 676–685.
128. Swift, S.R. and L. Trinkle-Mulcahy. Basic principles of FRAP, FLIM and FRET //Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications II, edited by Samuel Achilefu, Ramesh Raghavachari, *Proc. of SPIE*, 7576, 2004, 12.

129. Shimolina L.E., Izquierdo M.A., López-Duarte I., Bull J.A., Shirmanova M.V., Klapshina L.G., Zagaynova E.V., Kuimova M.K. Imaging tumor microscopic viscosity in vivo using molecular rotors. *Scientific Reports*, 2017, 7, 41097.
130. 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, 173, 62708.
131. Shimolina L.E., Gulin A.A., Paez-Perez M., López-Duarte I., Druzhkova I.N., Lukina M.M., Gubina M.V., Brooks N.J., Zagaynova E.V., Kuimova M.K., Shirmanova M.V. Mapping cisplatin-induced viscosity alterations in cancer cells using molecular rotor and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Journal of biomedical optics*, 2020, 25(12), 126004.
132. Shimolina L., Gulin A., Ignatova N., Druzhkova I., Gubina M., Lukina M., Snopova L., Zagaynova E., Kuimova M.K., Shirmanova M.V. The Role of Plasma Membrane Viscosity in the Response and Resistance of Cancer Cells to Oxaliplatin, *Cancers*, 2021, 13(24), 6165.
133. Shirmanova M.V., Shimolina L.E., Lukina M.M., Zagaynova E.V., Kuimova M.K. Live cell imaging of viscosity in 3D tumour cell models. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, 1035, 143-153.
134. Shirmanova, M.V., Druzhkova, I.N., Lukina, M.M., Dudenkova, V.V., Ignatova, N. I., Snopova, L. B., et al. Chemotherapy with cisplatin: insights into intracellular pH and metabolic landscape of cancer cells in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 2017, 7(1).
135. Szachowicz-Petelska, B.; Dobrzynska, I.; Sulkowski, S.; Figaszewski, Z. Characterization of the cell membrane during cancer transformation. *J. Environ. Biol.* 2010, 31, 845–850.
136. Cotte, A.K.; Aires, V.; Fredon, M.; Limagne, E.; Derangère, V.; Thibaudin, M.; Humblin, E.; Scagliarini, A.; De Barros, J.P.; Hillon, P.; et al. Lysophosphatidylcholine

acyltransferase 2-mediated lipid droplet production supports colorectal cancer chemoresistance. *Nat. Commun.* 2018, 9, 322.

137. Hilgemann, D.W.; Dai, G.; Collins, A.; Lariccia, V.; Magi, S.; Deisl, C.; Fine, M. Lipid signaling to membrane proteins: From second messengers to membrane domains and adapter-free endocytosis. *J. Gen. Physiol.* 2018, 150, 211–224.