



Санкт-Петербургский
государственный
университет



Privolzhsky Research
Medical University



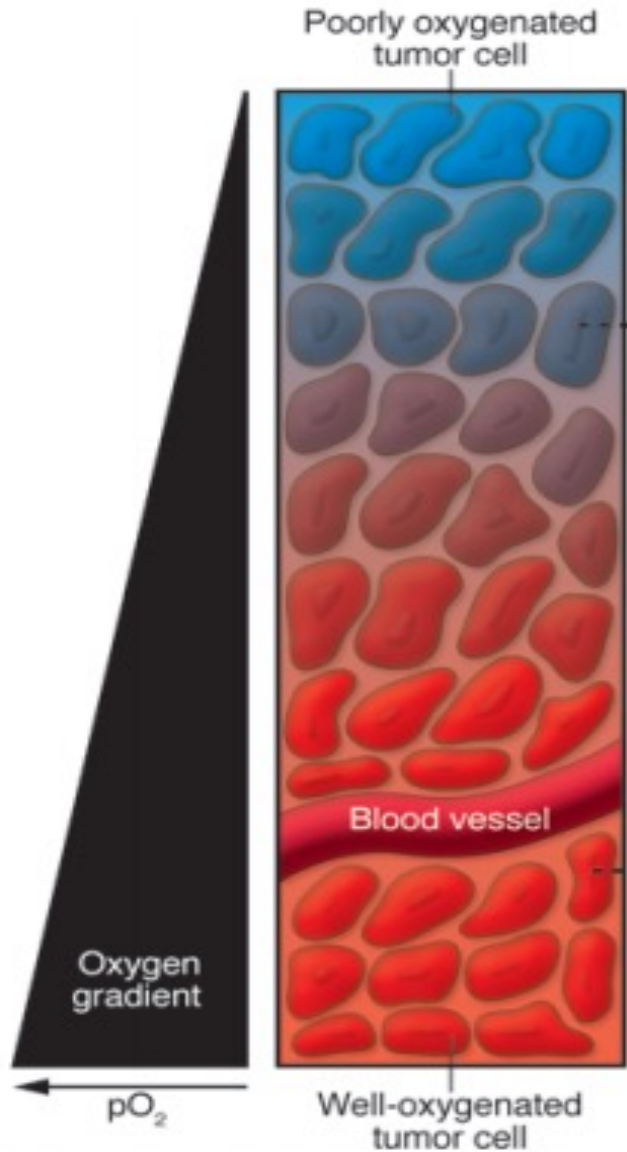
ОЦЕНКА КИСЛОРОДНОГО СТАТУСА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В МОДЕЛЯХ IN VITRO И IN VIVO МЕТОДОМ PLIM

А.Д. Комарова^{1,2}, И.С. Критченков³, А.А. Плеханов², В.И. Щеславский², М.В. Ширманова²

¹ ННГУ им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, 603022, пр-т Гагарина, 23

² НИИ ЭО и БМТ, ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, г. Нижний Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1

³ СПбПУ, Санкт-Петербург, 195251, Политехническая, 29



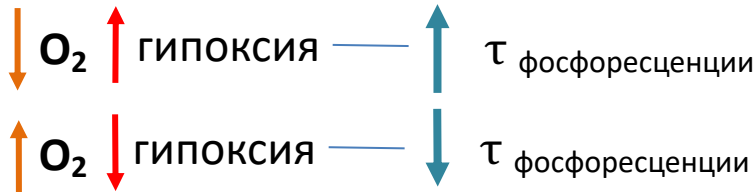
Причины гипоксии:

- Высокий уровень пролиферации клеток
- Формирование патологического кровоснабжения

Следствия гипоксии:

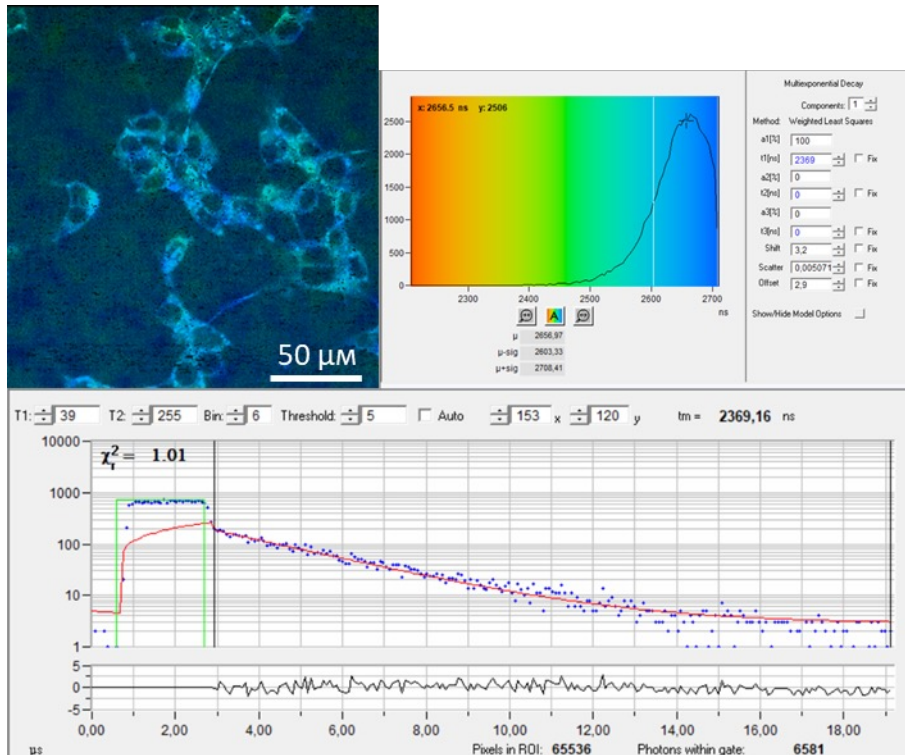
- Гибель нормальных клеток
- Стимуляция опухолевой прогрессии
- Низкая эффективность лечения

ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЙ ИМИДЖИНГ С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ (PHOSPHORESCENCE LIFETIME IMAGING, PLIM)



Уравнение Штерна-Фольмера:

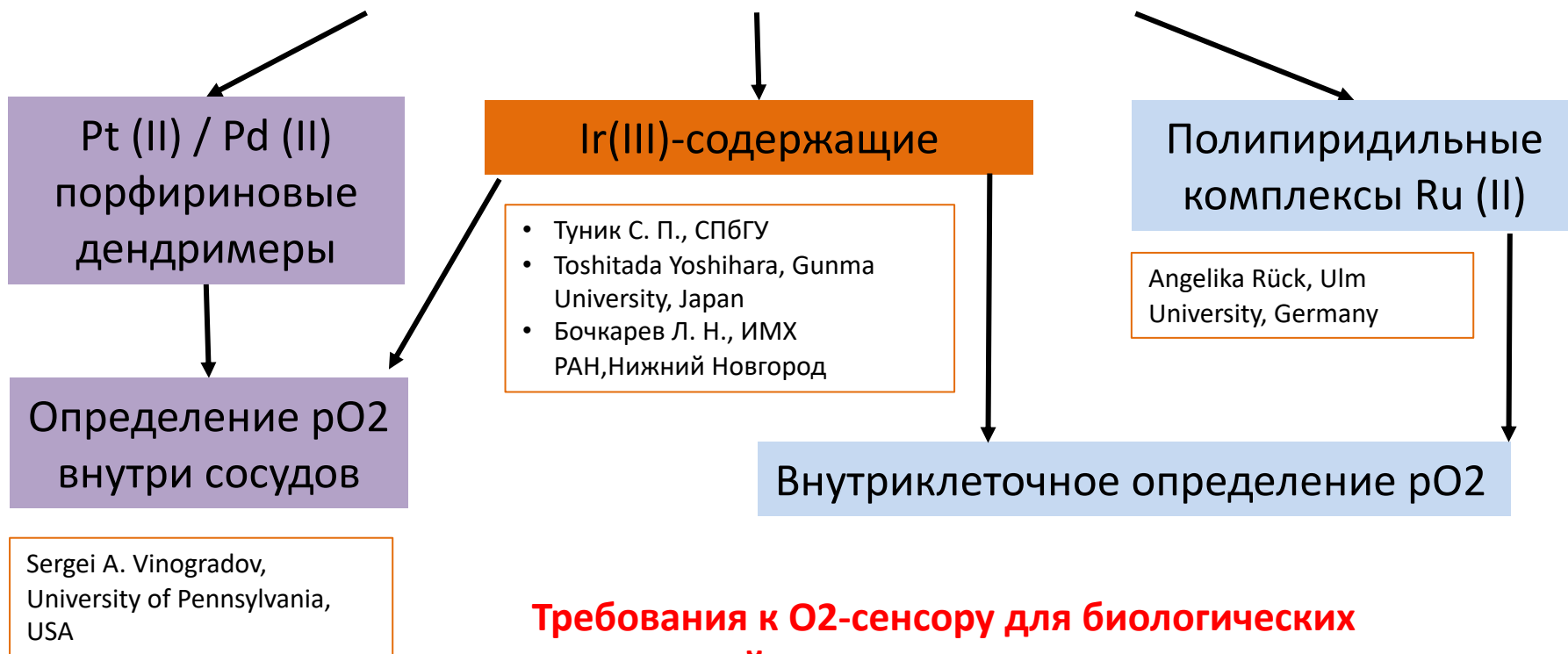
$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} [O_2]$$



Преимущества метода PLIM:

- Малоинвазивность
- Безопасность оптического излучения
- Субклеточное и тканевое разрешение:
 - Микроскопия
 - Макроимиджинг
 - Спектроскопия
- Анализ в **живых** клетках и тканях
- Время жизни фосфоресценции не зависит от концентрации и интенсивности сигнала сенсора
- В режиме **реального времени**

Металлорганические фосфоресцентные комплексы



Требования к O₂-сенсору для биологических приложений:

1. Высокая чувствительность времени жизни фосфоресценции к O₂
2. Низкая цитотоксичность
3. Водорастворимость
4. Накопление в опухолях

Цель работы: Оценка кислородного статуса экспериментальных опухолей в моделях *in vivo* методом **PLIM** при проведении таргетной анти-VEGF терапии с применением новых флуоресцентных комплексов на основе иридия.

Задачи:

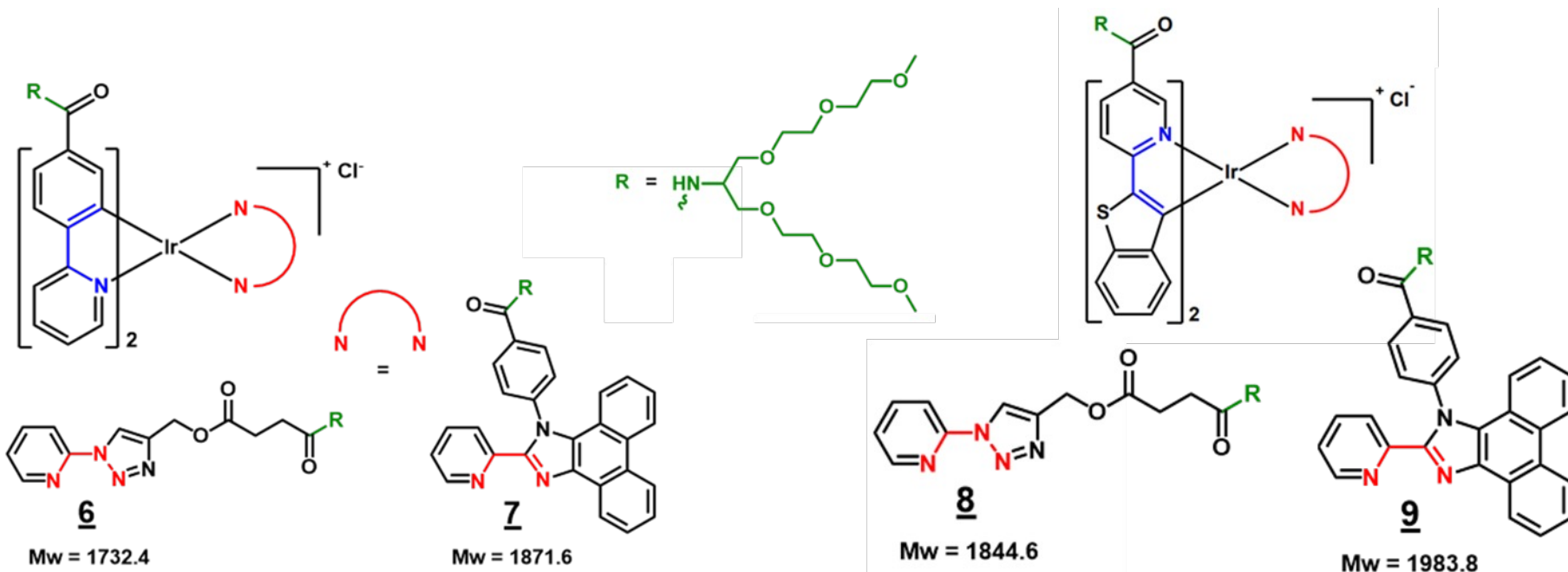
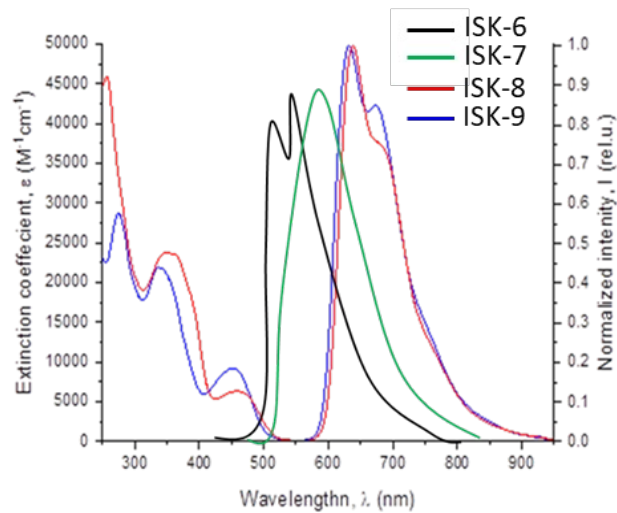
1. Биологическое тестирование новых флуоресцентных иридиевых комплексов на молекулярный кислород *in vitro*;
2. Разработка методики визуализации кислородного статуса опухолей методом **PLIM** *in vivo*;
3. Оценка кислородного статуса опухолей *in vivo* методом **PLIM**-микроскопии при проведении таргетной анти-VEGF терапии.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ФОСФОРЕСЦЕНТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ



Санкт-Петербургский
государственный
университет

Сенсоры ISK-6, ISK-7, ISK-8, ISK-9
предоставлены научной группой
к.х.н. И.С. Критченкова (СПбГУ)



СТ26 - колоректальный рак мыши

- Монослой клеток
- Модель опухоли на мышах линии Balb/c (n=12)

МТТ-тест – оценка цитотоксичности

Лазерная сканирующая микроскопия

на установке **LSM 880** (Carl Zeiss, Германия)

Анализ динамики накопления:

$\lambda_{ex} = 750 \text{ нм}$, $\lambda_{em} = 500\text{-}650 \text{ нм}$ (ISK-6-7) $\lambda_{em} = 650\text{-}750 \text{ нм}$ (ISK-8-9), 6 мВт

Анализ субклеточного распределения:

LysoTracker - $\lambda_{ex} = 488 \text{ нм}$, $\lambda_{em} = 500 - 600 \text{ нм}$;

MitoTracker - $\lambda_{ex} = 405 \text{ нм}$, $\lambda_{em} = 450 - 490 \text{ нм}$

Флуоресцентный имиджинг PLIM

на основе **TCSPC** (time-correlated single photon counting)

- Лазерный сканирующий микроскоп **LSM 880** (Carl Zeiss, Германия)

$\lambda_{ex} = 750 \text{ нм}$, $\lambda_{em} = 500\text{-}650 \text{ нм}$ (ISK-6-7) $\lambda_{em} = 650\text{-}750 \text{ нм}$ (ISK-8-9)

Таргетная анти-VEGF терапия

Авастин (действующее вещество Бевацизумаб) в дозировке **10 мкг/гк** ежедневно в виде внутрибрюшинной инъекции

Обработка и анализ результатов

SPCImage 8.5 (Becker & Hickel GmbH, Германия)

ImageJ (National Institutes of Health, США)

STATISTICA10 (StatSoft, США)

ZEN 3.5 Blue (Carl Zeiss, Германия)

средние значения и стандартное отклонение, t-критерий ($p \leq 0,05$)



Проведение МТТ-теста

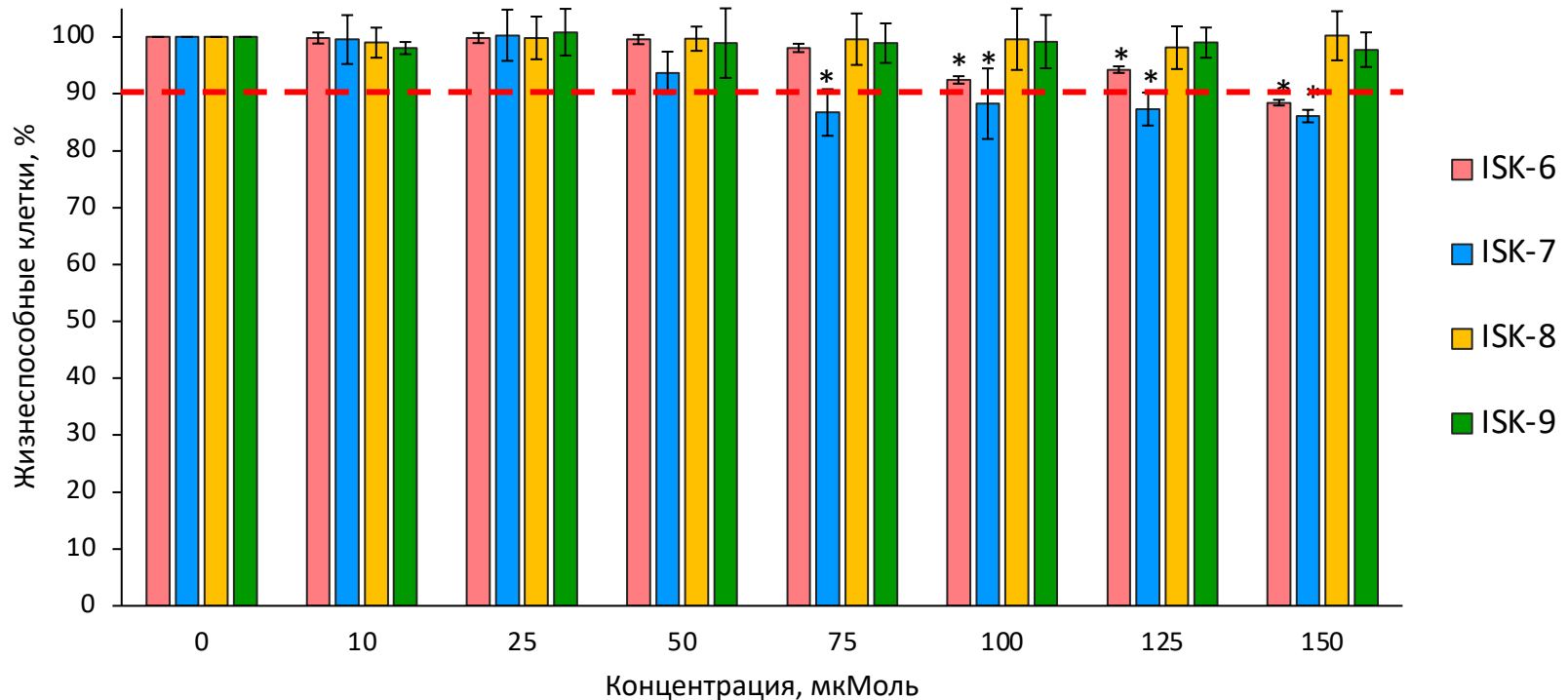


Модель опухоли СТ26 на ухе мыши



Лазерный сканирующий микроскоп LSM 880 (Carl Zeiss, Германия)

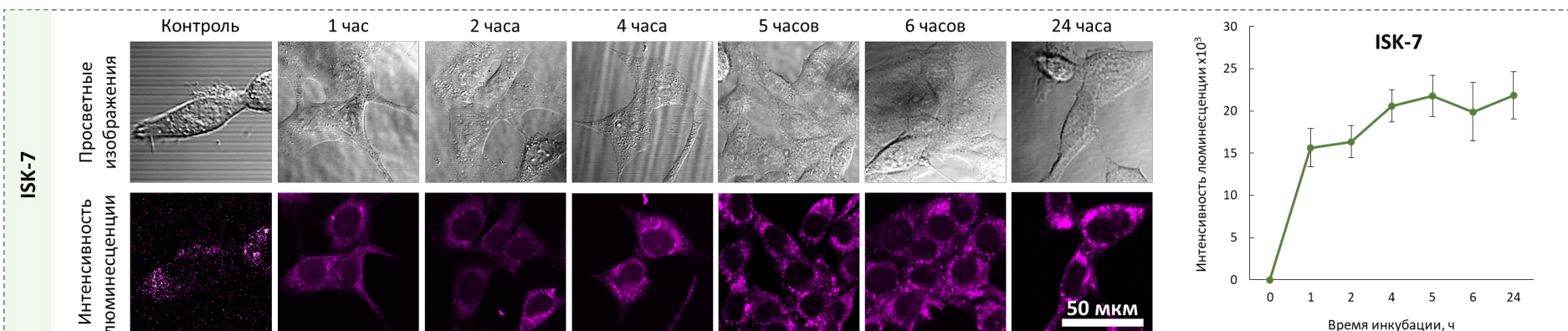
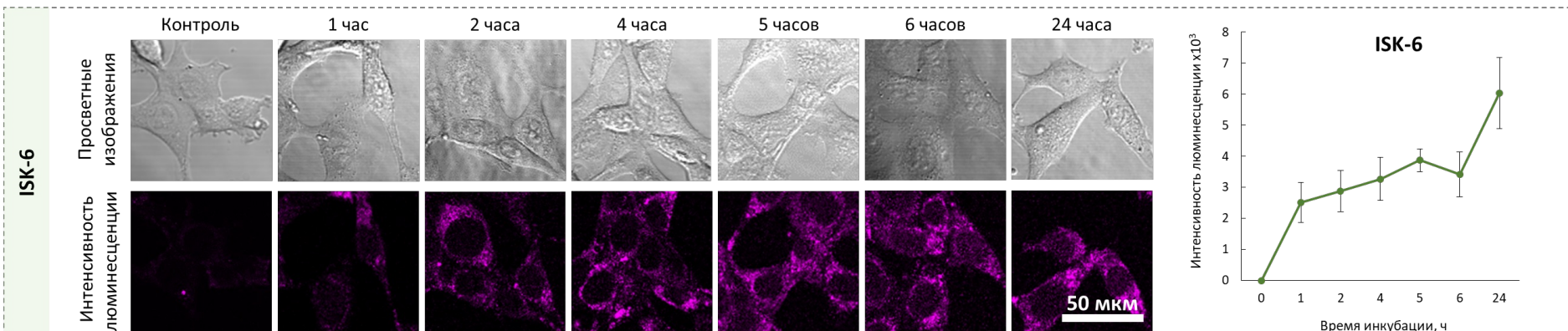
РЕЗУЛЬТАТЫ. ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОМПЛЕКСОВ МЕТОДОМ МТТ-ТЕСТА НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ СТ26



Mean \pm SD, * - статистически значимое отличие от контроля, $p \leq 0,05$, $n=3$.

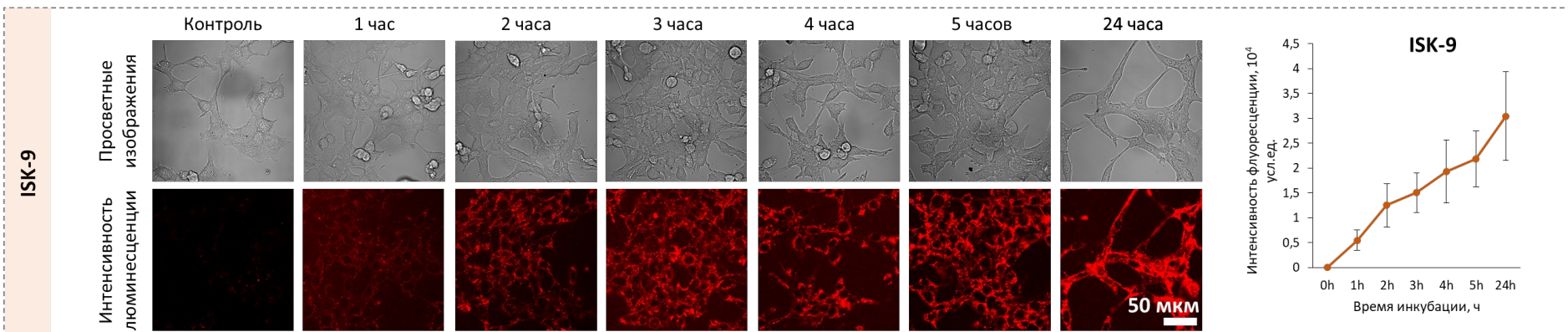
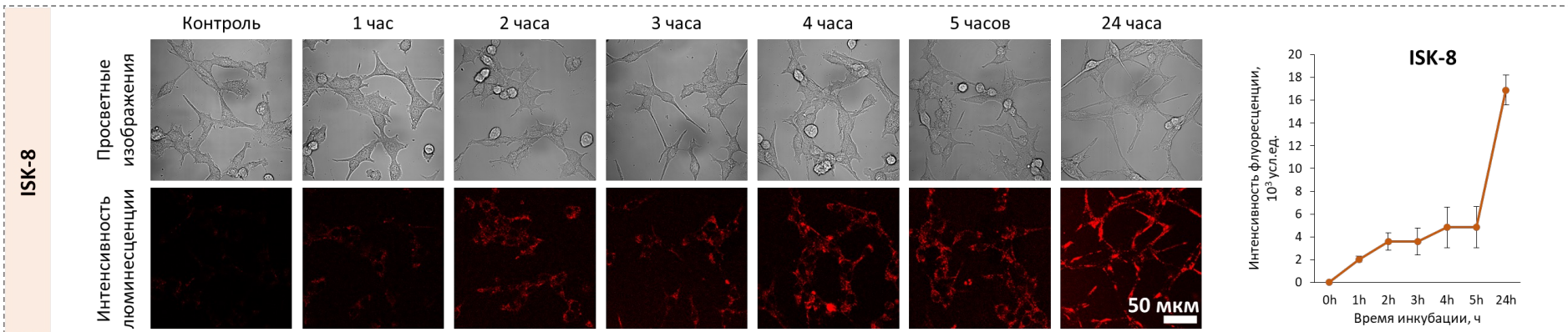
Исследуемые комплексы не проявляют выраженной цитотоксичности.

ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ СТ26 IN VITRO ФОСФОРЕСЦЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ



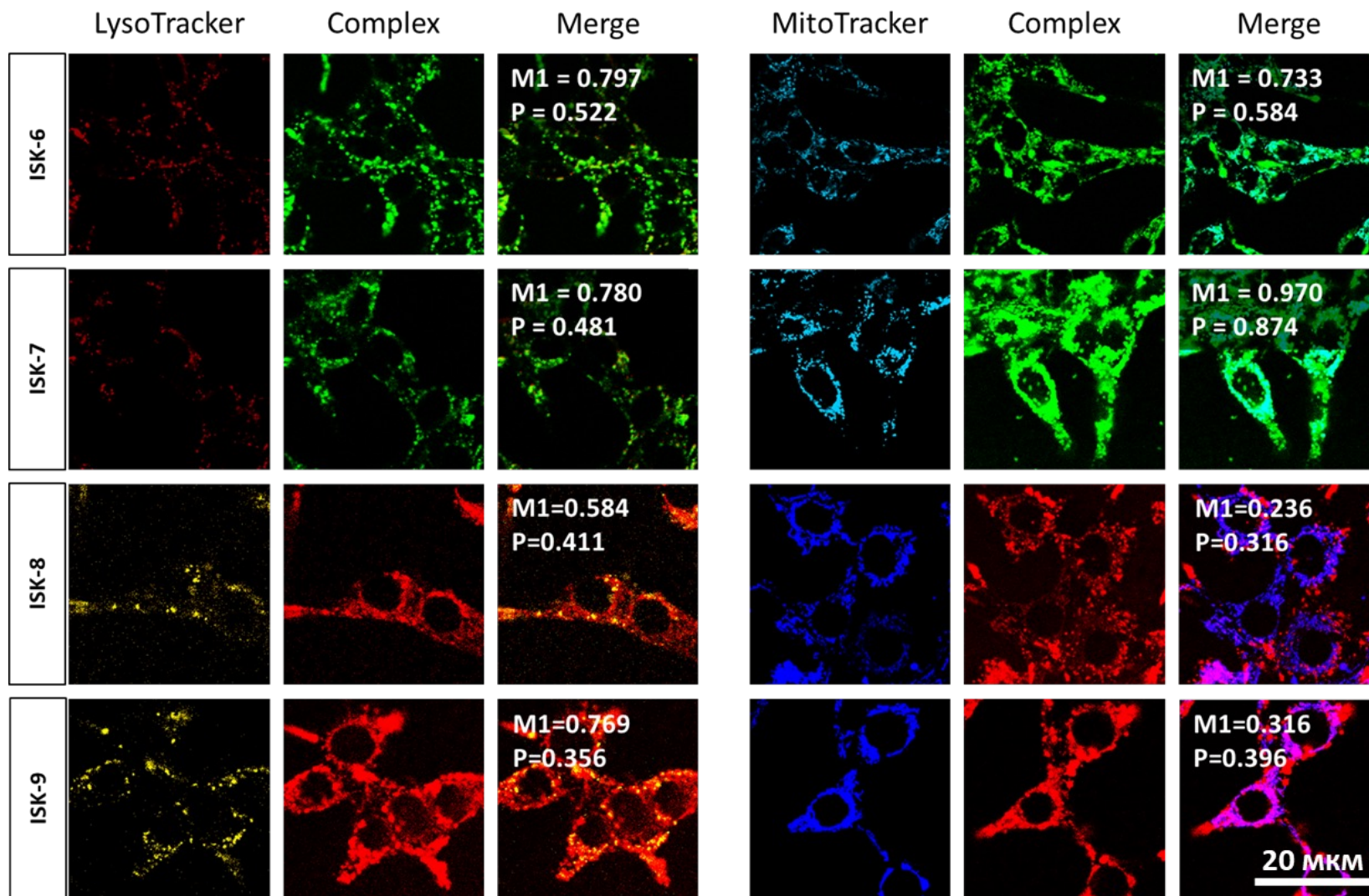
Комплексы ISK-6 и ISK-7 проникают в живые опухолевые клетки СТ26.

ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ СТ26 IN VITRO ФОСФОРЕСЦЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ



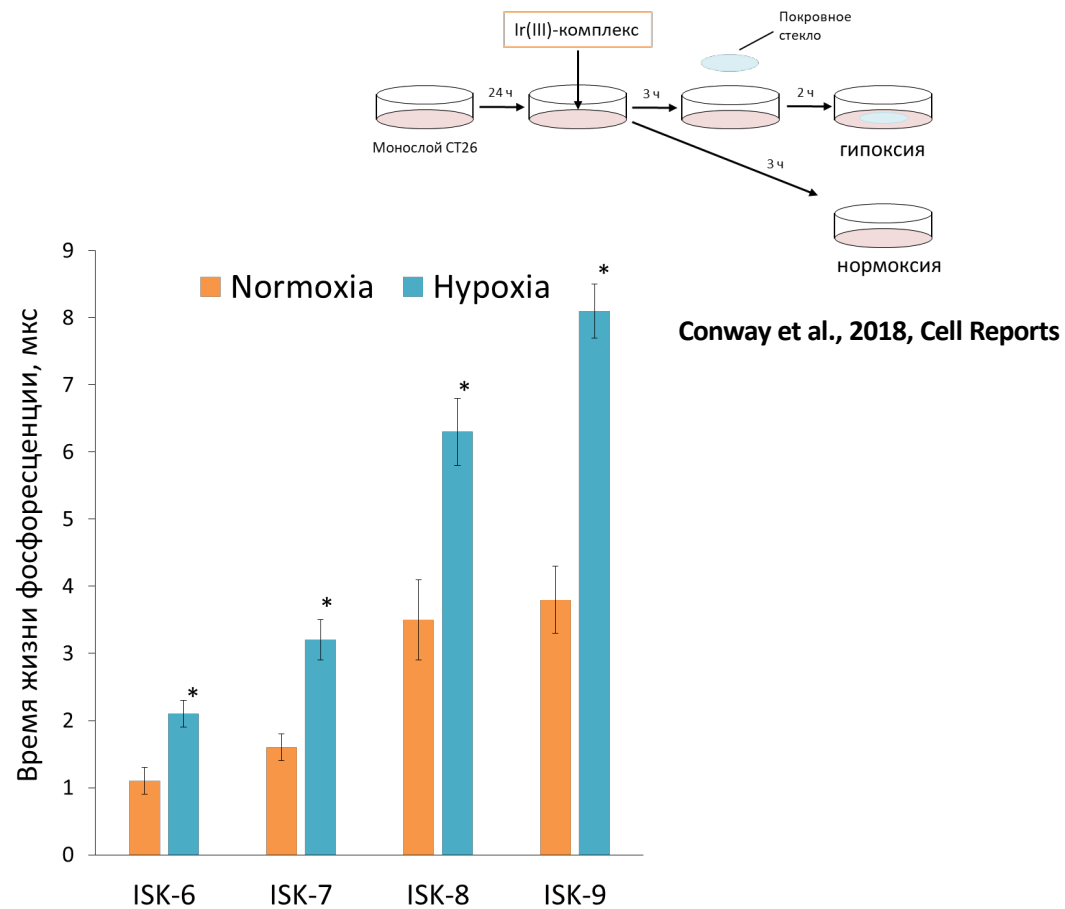
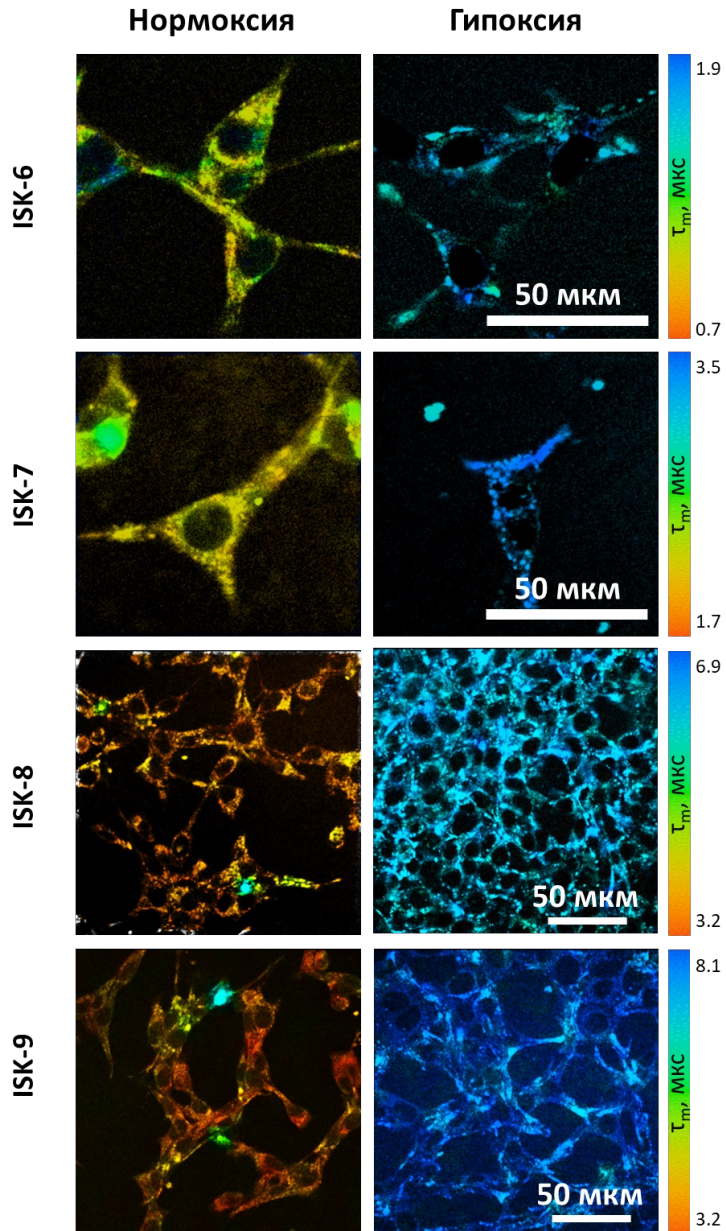
Комплексы ISK-8 и ISK-9 проникают в живые опухолевые клетки СТ26.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФОСФОРЕСЦЕНТНЫХ СЕНСОРОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ CT26 *IN VITRO*



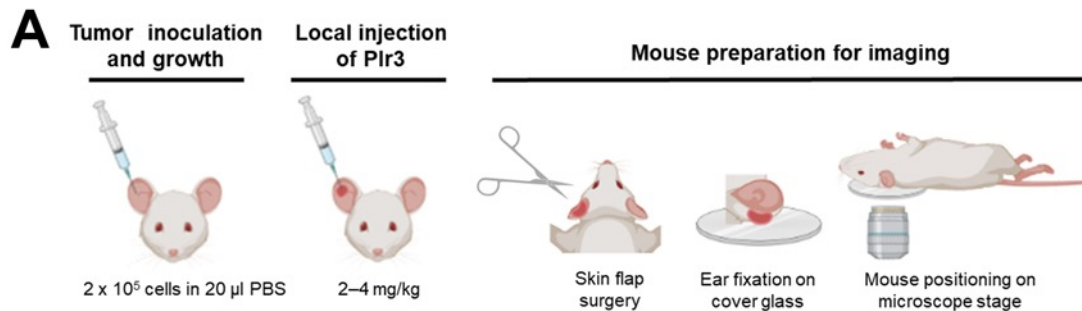
Комплексы **ISK-6** и **ISK-7** локализуются преимущественно в лизосомах и митохондриях, **ISK-8** и **ISK-9** – преимущественно в лизосомах и диффузно в цитозоле.

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СЕНСОРОВ К МОЛЕКУЛЯРНОМУ КИСЛОРОДУ IN VITRO

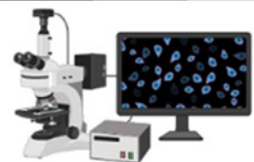


Комплексы имеют схожую чувствительность к молекулярному кислороду. Комплекс **ISK-9** имеет наиболее широкий динамический диапазон чувствительности.

МЕТОДИКА ВИЗУАЛИЗАЦИИ КИСЛОРОДНОГО СТАТУСА IN VIVO МЕТОДОМ PLIM

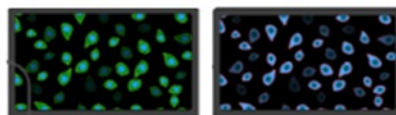


Search of the zone of interest



NAD(P)H fluorescence intensity:
ex. 750 nm, reg. 450–490 nm

Simultaneous PLIM/ FLIM

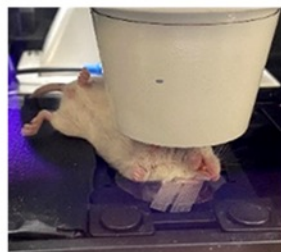


NAD(P)H FLIM: ex. 750 nm, reg. 450–490 nm
Plr3 PLIM: ex. 750 nm, reg. 570–640 nm

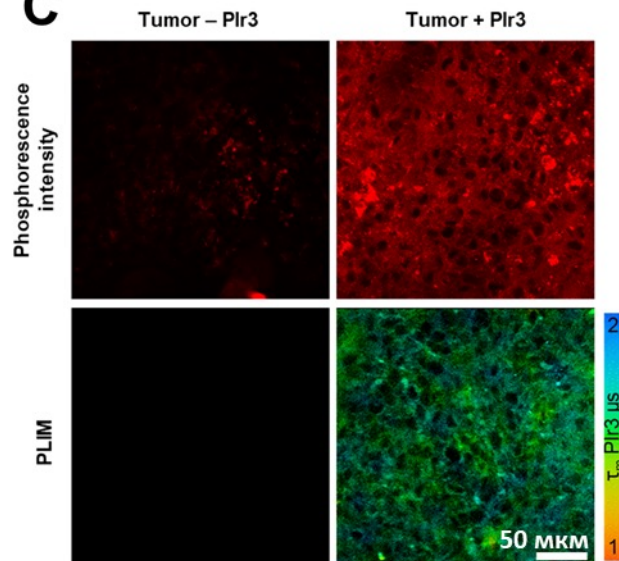
Параметры визуализации сенсора **ISK-9** in vivo:

- 30 мг/кг для *in vivo*
- Локальная инъекция
- PLIM $\lambda_{ex}=750$ нм $\lambda_{em}=650-750$ нм
- Время сбора сигнала 120 с

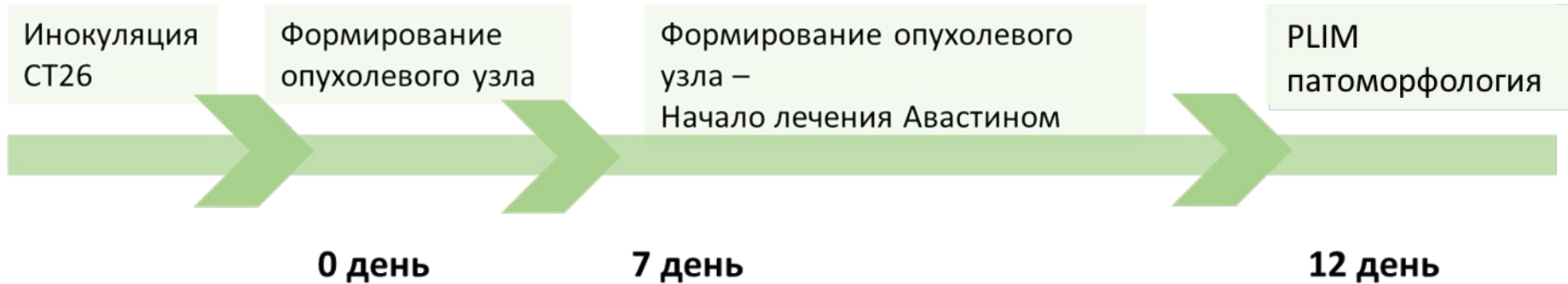
B



C

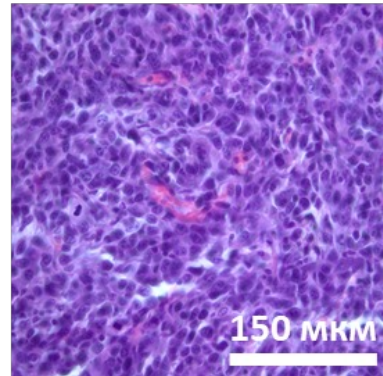
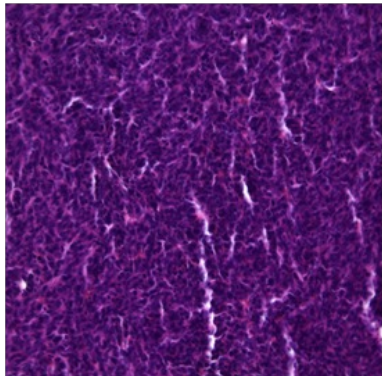
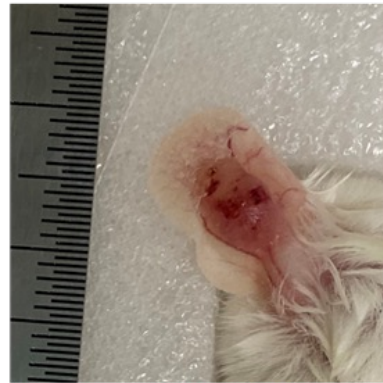
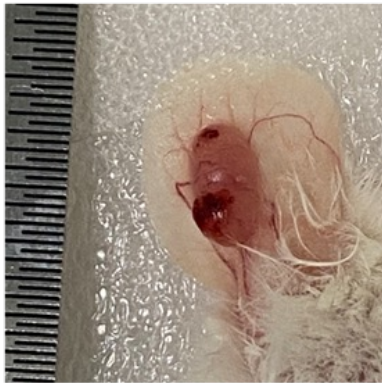


ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА ПО ЛЕЧЕНИЮ ОПУХОЛЕЙ АНТИ-VEGF ТЕРАПИЕЙ

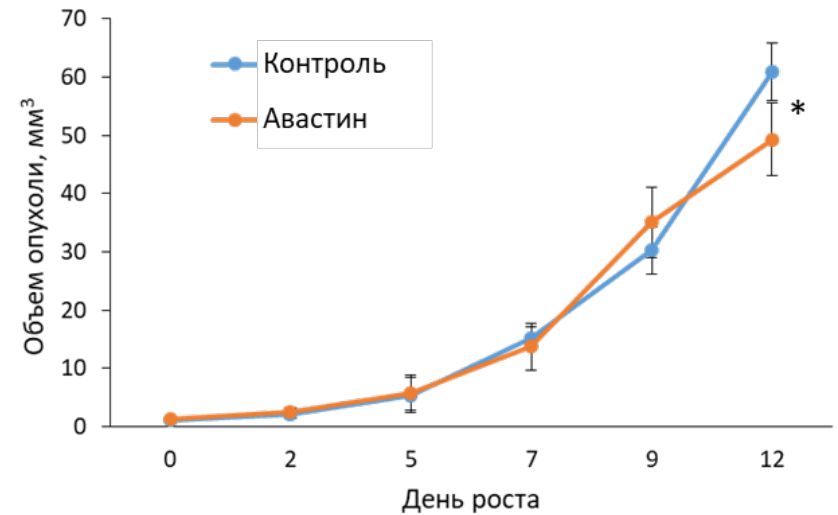


Контроль

+Авастин



ГЭ



Mean \pm SD, * - статистически значимое отличие от контроля, $p \leq 0,05$, $n=10$.

1. Проведено биологическое тестирование новых флуоресцентных сенсоров на кислород. Установлено, что комплексы **ISK-6, ISK-7, ISK-8** и **ISK-9** являются не токсичными, проникают в живые опухолевые клетки. Исследуемые комплексы имеют высокую чувствительность к молекулярному кислороду *in vitro*.
2. Показана возможность *in vivo* оценки кислородного статуса опухолей методом **PLIM** с помощью комплекса **ISK-9**.
3. Выполнено исследование кислородного статуса в ответ на анти-VEGF терапию в опухолях *in vivo* методом **PLIM** с новым флуоресцентным сенсором **ISK-9**.

Спасибо за внимание!

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект 23-65-10005



Можеров А.М.



Плеханов А.А.



Шимолина Л.Е.



Щеславский В.И.



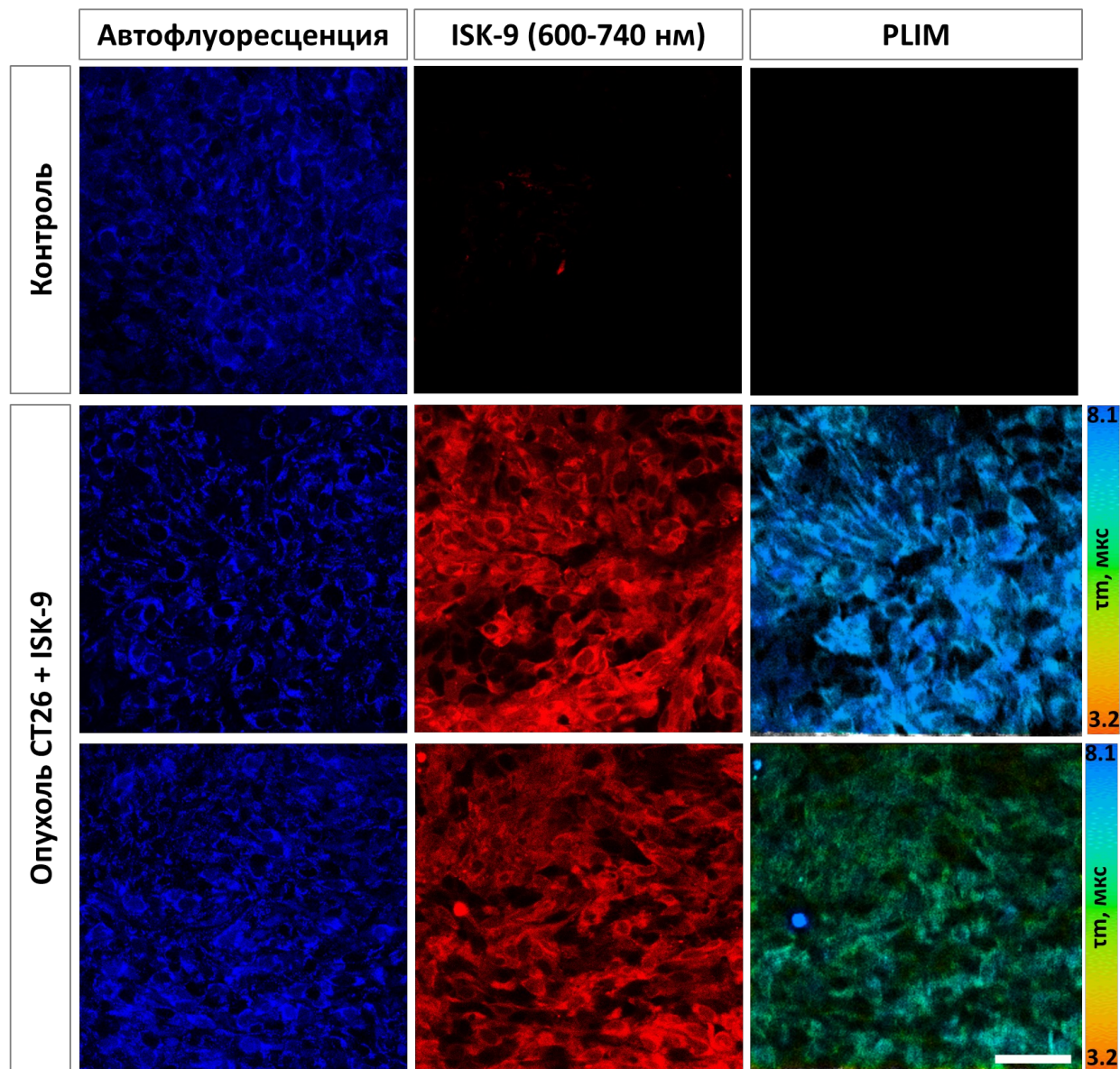
Ширманова М.В.

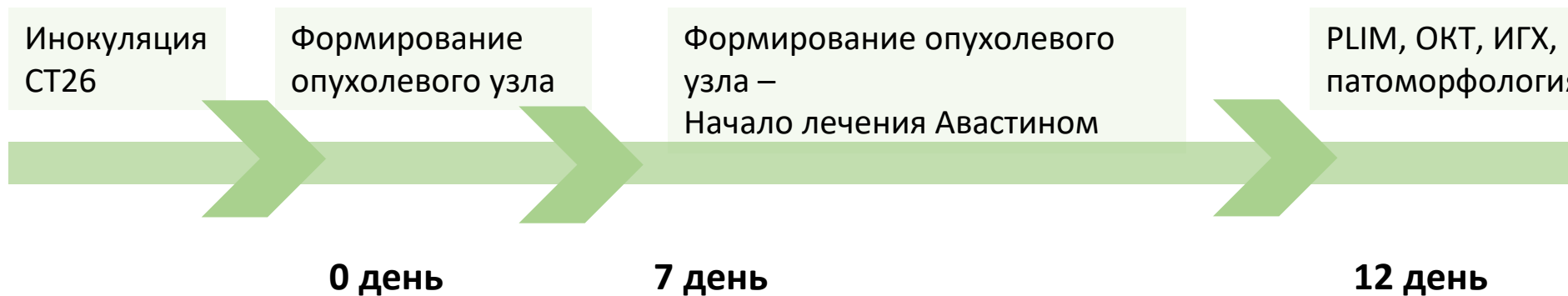


Санкт-Петербургский
государственный
университет

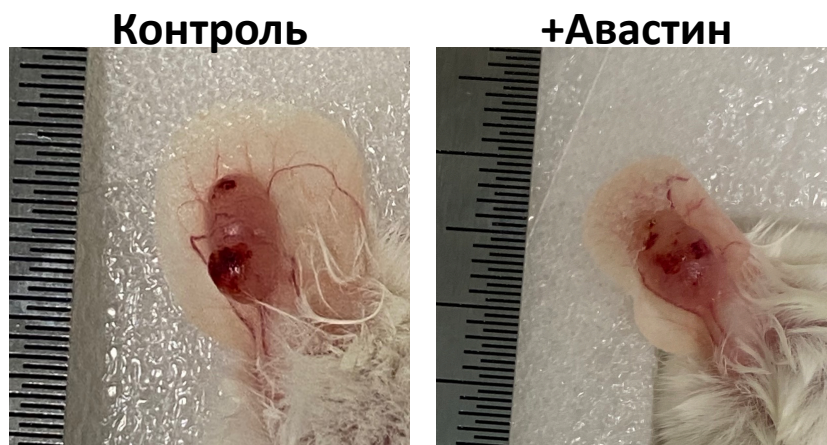
Туник С.П.

Критченков И.С.

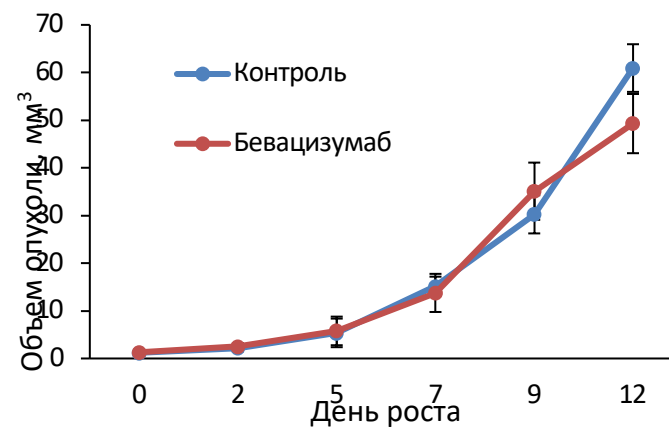
Б

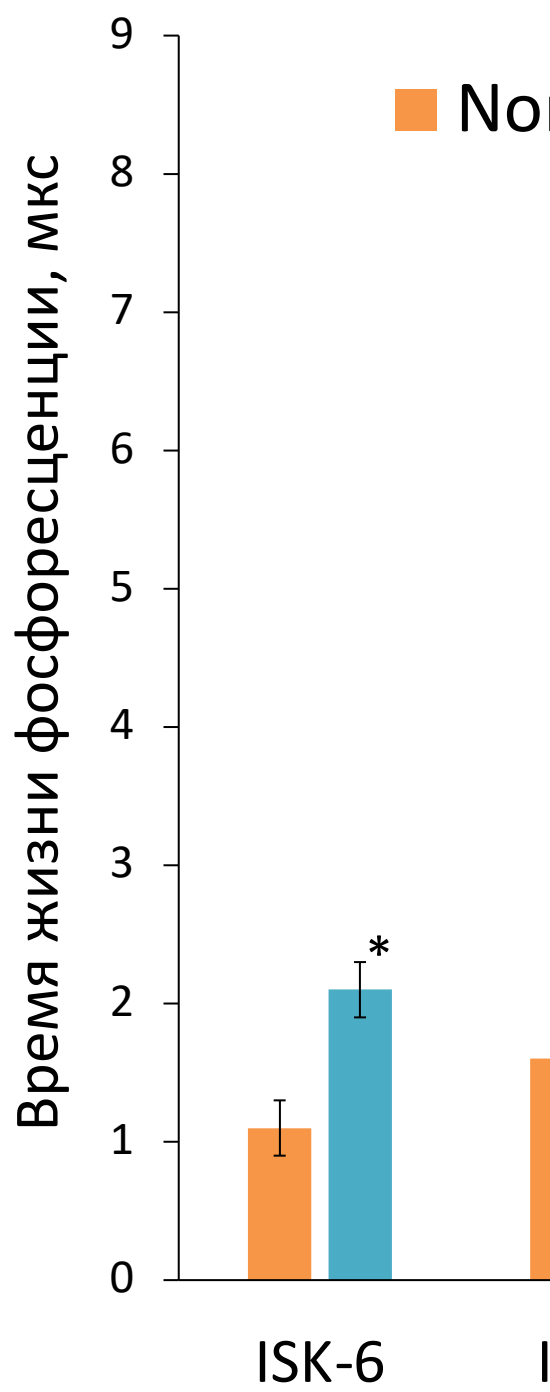
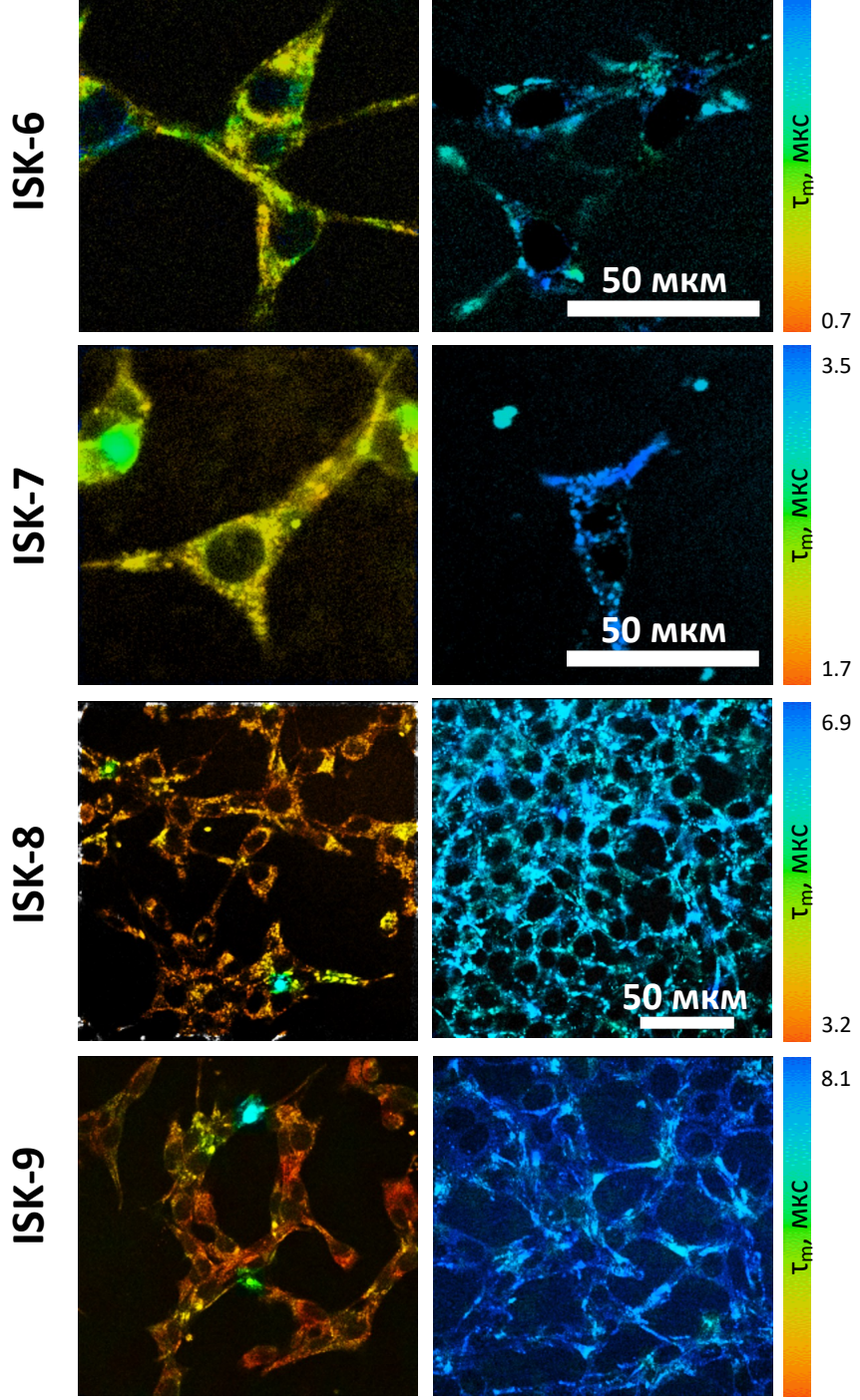


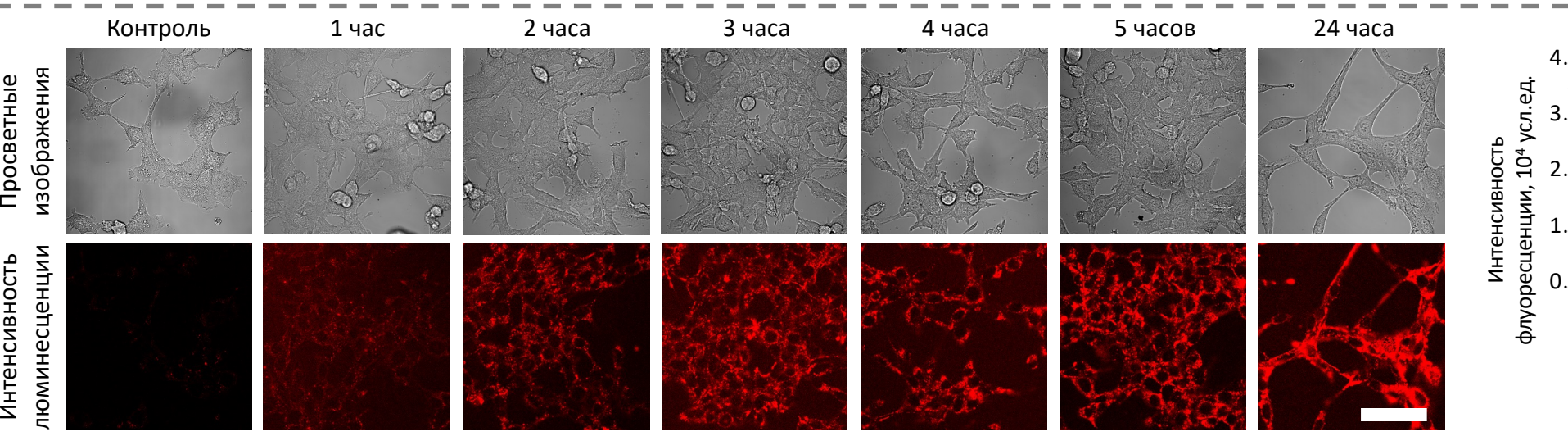
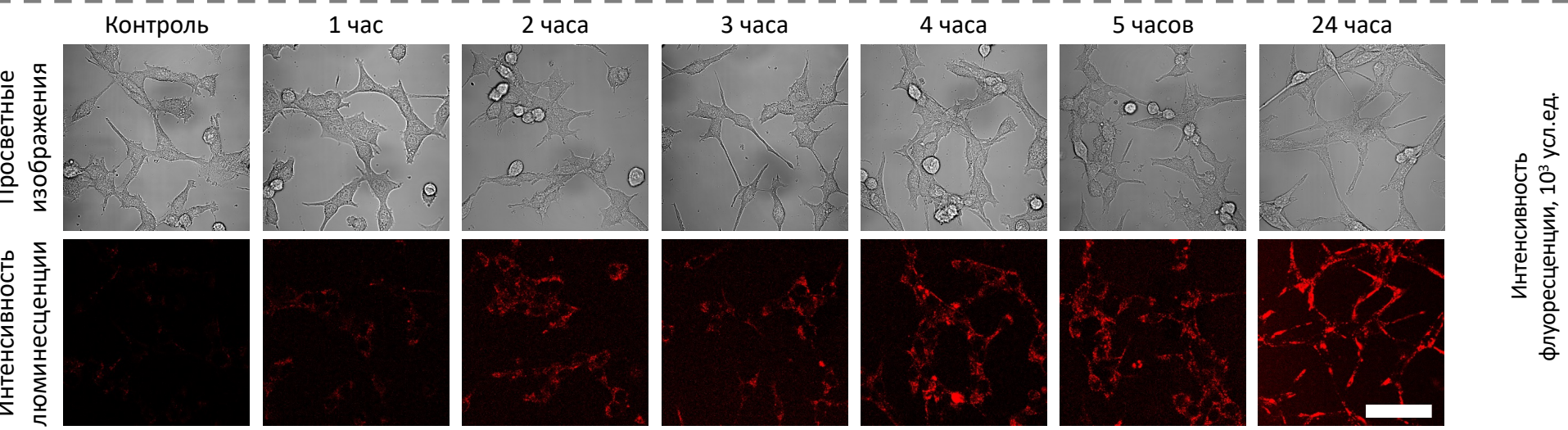
Б



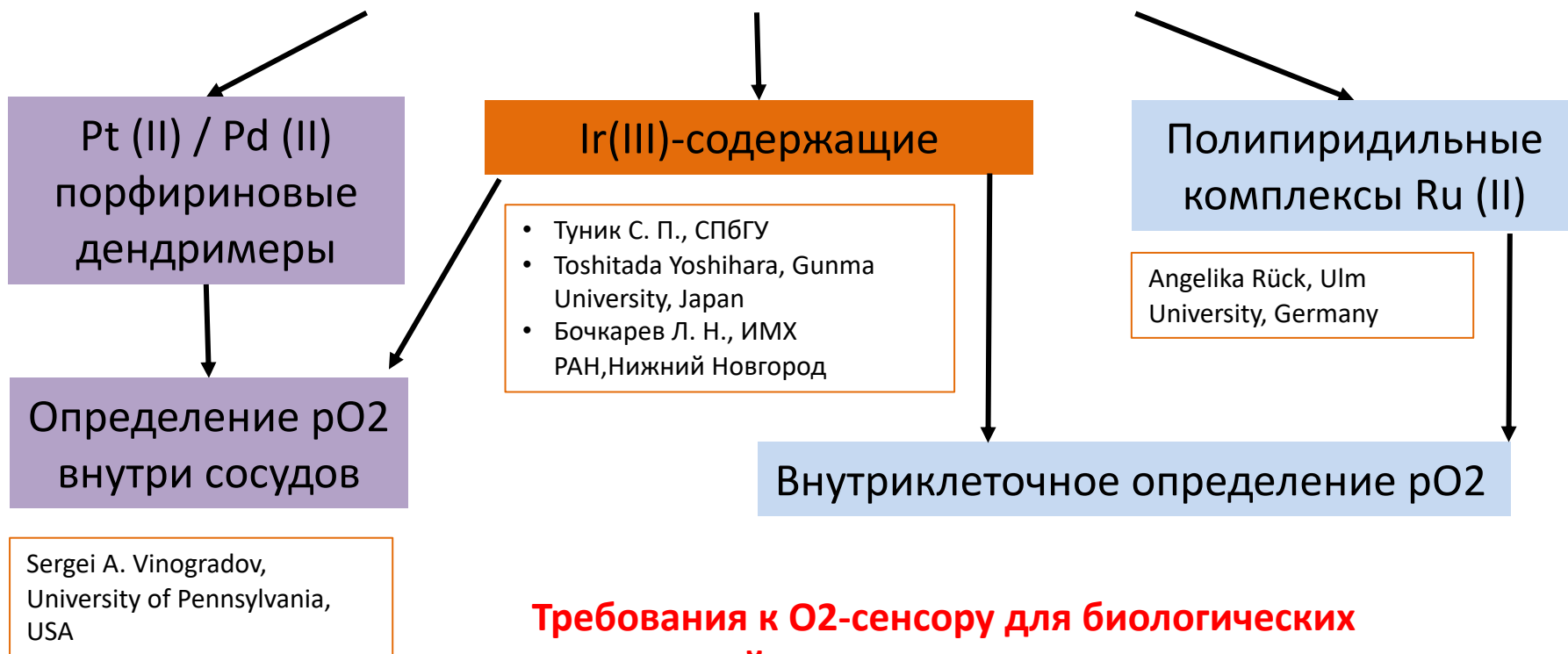
В







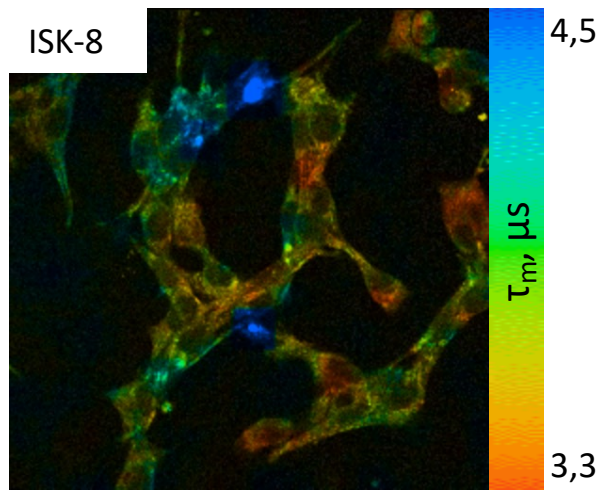
Металлорганические фосфоресцентные комплексы



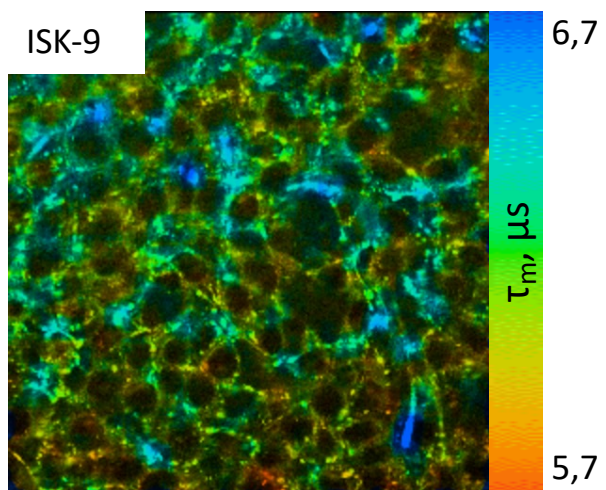
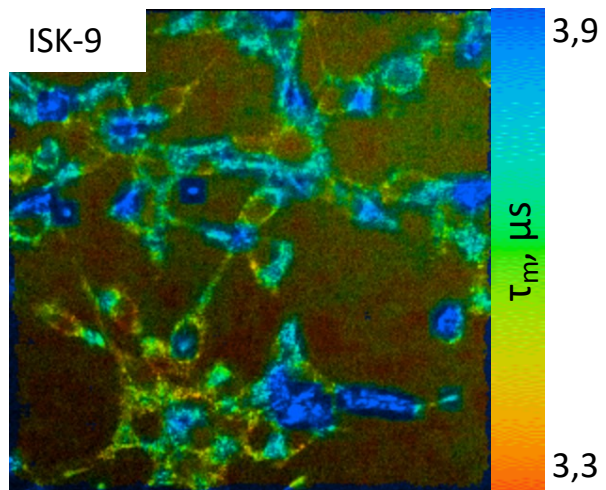
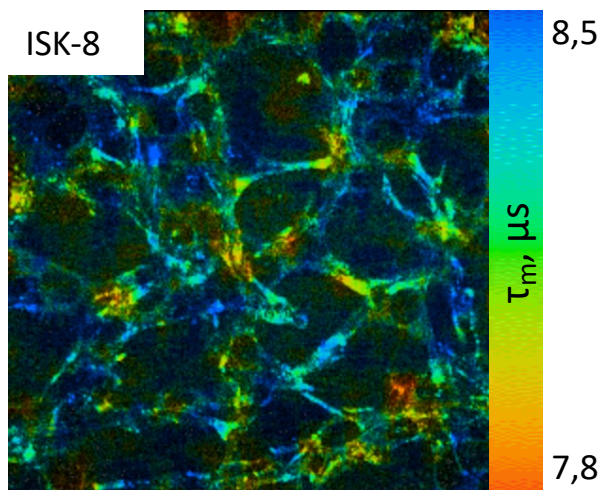
Требования к O₂-сенсору для биологических приложений:

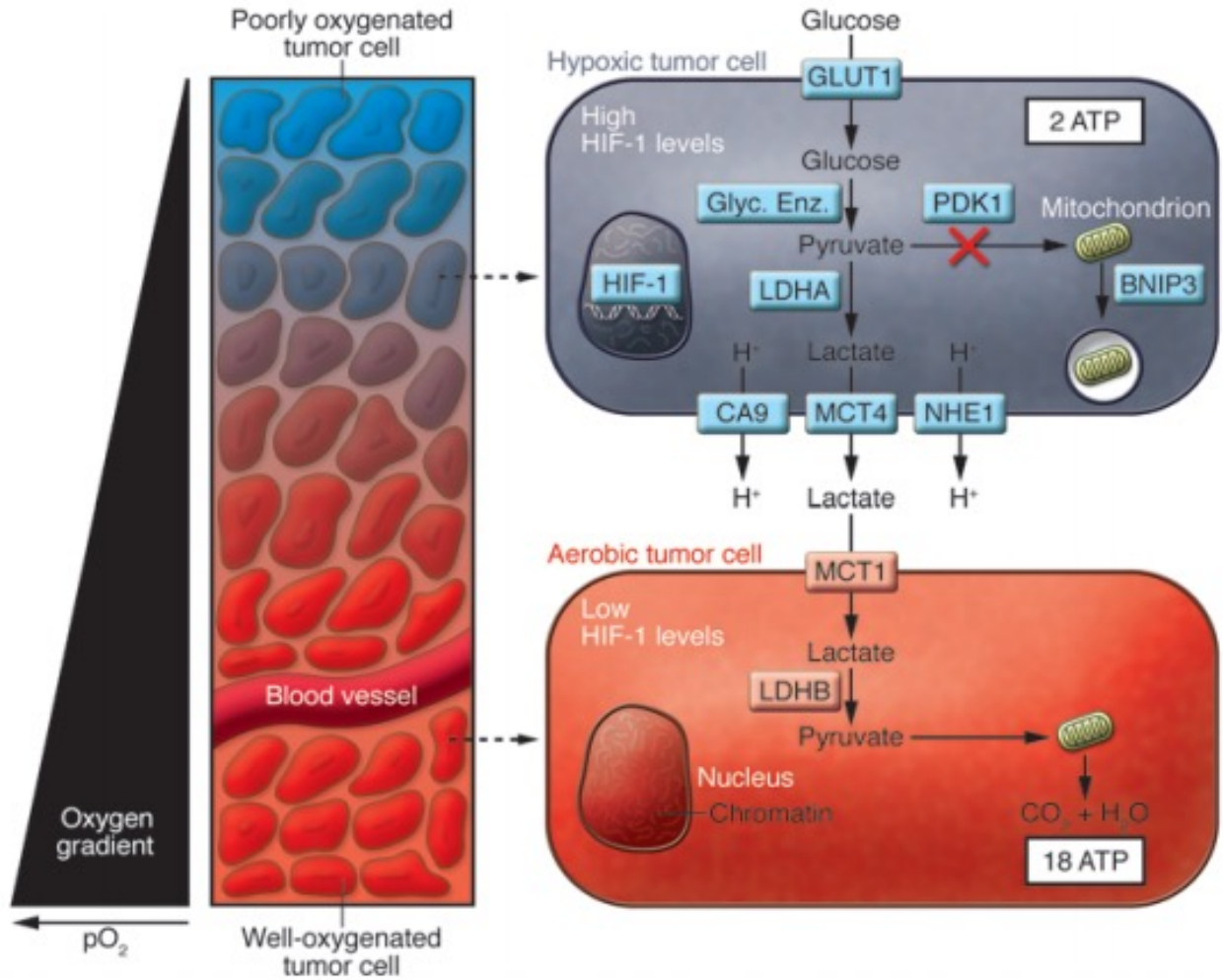
1. Высокая чувствительность времени жизни фосфоресценции к O₂
2. Низкая цитотоксичность
3. Водорастворимость
4. Накопление в опухолях

НОРМОКСИЯ



ГИПОКСИЯ





Методы оценки кислорода в тканях

Кислородные полярографические электроды

Инвазивный
Поверхностные ткани

Оптические методы

- Неинвазивные
- Безопасные
- В реальном времени

ИГХ

Анализ гипоксии в срезах ткани.
Пимонидазол – $pO_2 < 10$ мм.рт.ст.

Генетически кодируемый сенсор гипоксии UnaG на основе **GFP** (зелёный флуоресцентный белок)

Фосфоресцентный имиджинг с временным разрешением (**PLIM**)

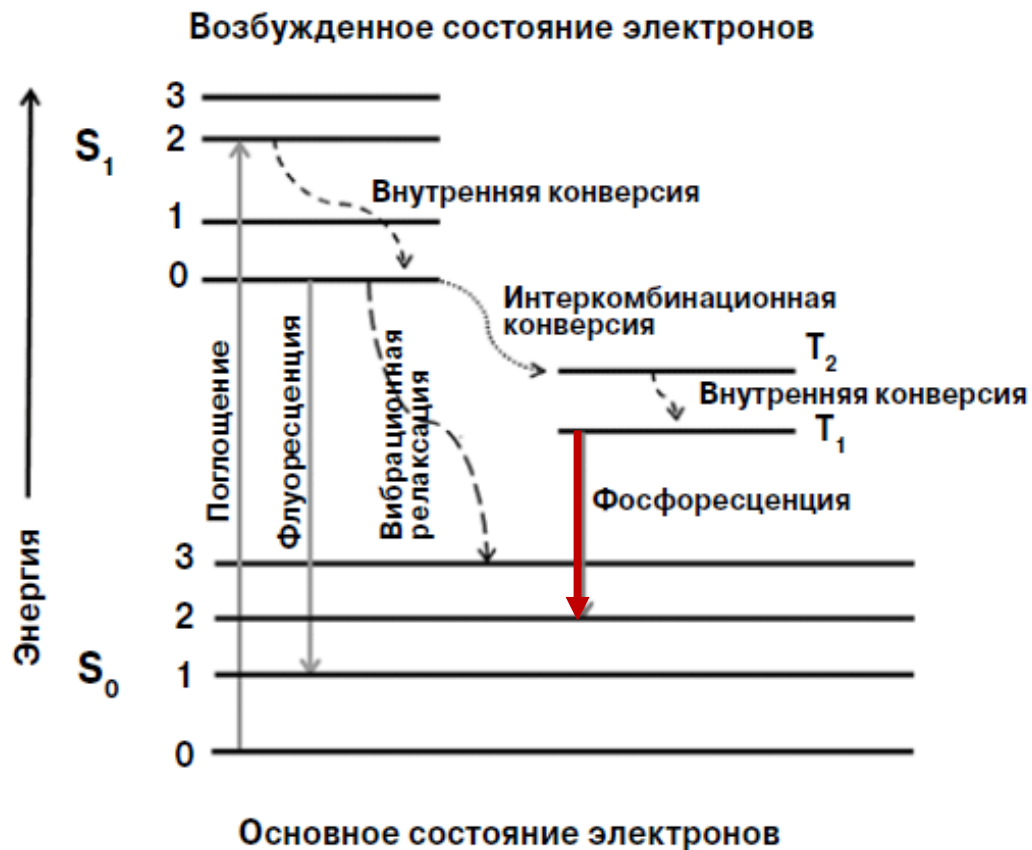
Оптическая диффузионная спектроскопия (**ОДС**) и оптическая диффузионная томография (**ОДТ**)

- косвенные методы оценки кислородного статуса опухолей по поглощению света гемоглобином

Оптоакустический имиджинг

- зондирование ткани на глубинах от мм до см
- оптоакустическая томография и оптоакустическая микроскопия

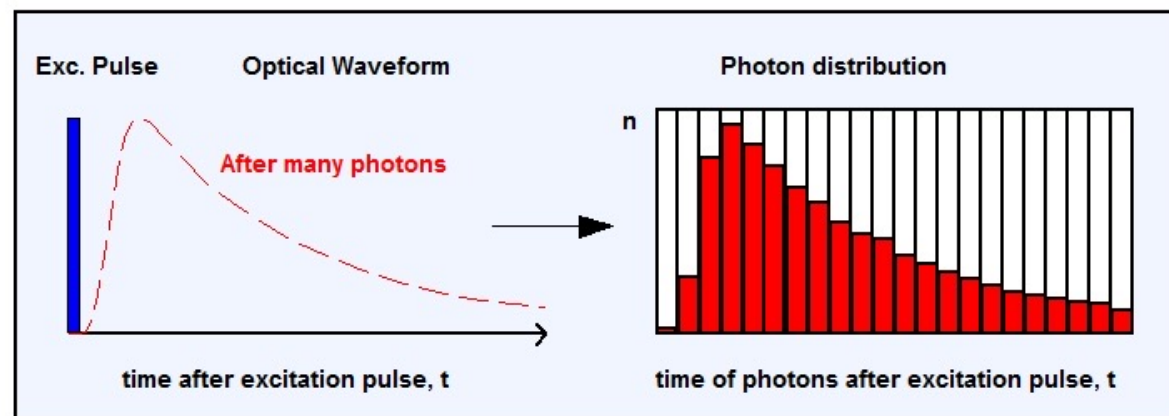
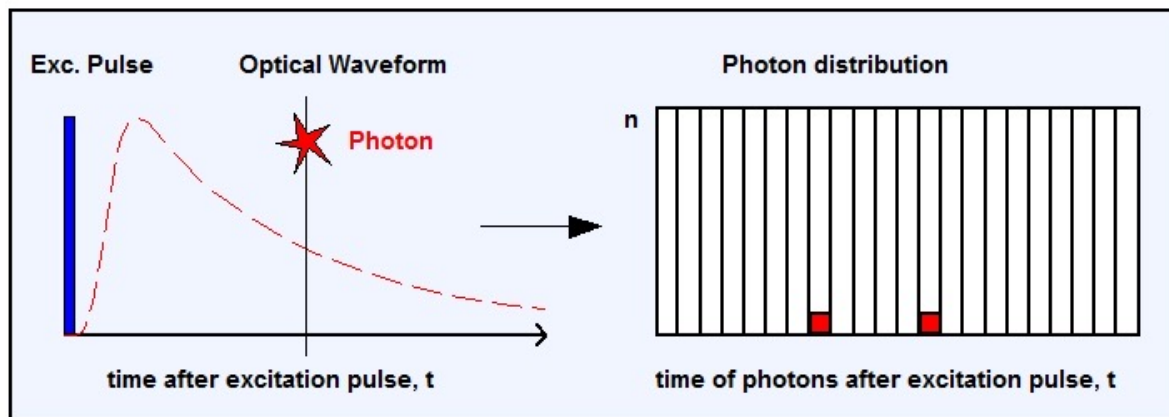
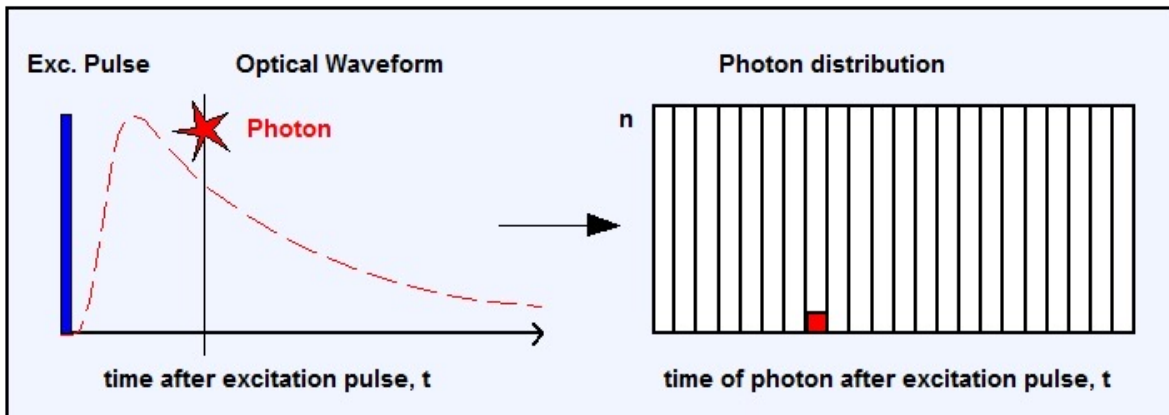
Фосфоресценция – излучательный процесс, сопровождающий переход молекулы из триплетного состояния T1 в основное S0.



Флуоресценция = 10^{-8} с

Фосфоресценция > 10^{-6} с

Рис. 2. Диаграмма Яблонского для органических молекул и характеристика основных процессов (Пучков, 2014)



Регистрация времени жизни флуоресценции и фосфоресценции на основе время-коррелированного счета фотонов (TCSPC): А- Принцип время-коррелированного счета фотонов (TCSPC)

Уравнение Штерна-Фольмера:

$$I_0/I = \tau_0/\tau = 1 + K_{sv} [O_2]$$

$$[O_2] = (\tau_0 - \tau) / (\tau \times K_s - v)$$