



МАТЕРИАЛЫ

ВСЕРОССИЙСКОЙ МЕЖДИСЦИПЛИНАРНОЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНЫ

FLUORESCENCE FOR BIOMEDICINE, FLUOBIOMED-2024

8-11 СЕНТЯБРЯ 2024 ГОДА

Г. НИЖНИЙ НОВГОРОД

Редакционная коллегия:

Щеславский Владислав Игоревич

к.ф.-м.н., заведующий лабораторией оптической спектроскопии и микоскопии НИИ
Экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава
России

Загайнова Елена Вадимовна

Член-корреспондент РАН, профессор РАН, д.м.н., заместитель генерального директора по развитию
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Материалы печатаются в авторской редакции. За достоверность опубликованных авторами
данных издательство и редакционная коллегия ответственность не несет.

СОДЕРЖАНИЕ

Wolfgang Becker

Quantitative Metabolic Imaging by NAD(P)H / FAD FLIM..... 10

Z.V. Besedovskaia, A.Yu. Korobov, D.A. Ushakov, N.I. Kudriashova, M. Trofimov, S.V. Nemirova, A.G. Orlova, P.V. Subochev

Norm and pathology predictions: Vasculature changes ML-based clustering of optoacoustic imaging segmented data..... 11

Riccardo Cicchi

Delineation of Fresh Gastrointestinal Tumor Biopsies Using a Fiber-based Fluorescence Lifetime Imaging Probe..... 12

M. Kirillin, D. Kurakina, A. Khilov, M. Shakhova, V. Perekatova, N. Shishkova, A. Mironycheva, A. Malygina, I. Shlivko, N. Orlinskaya, S. Gamayunov, I. Turchin, E. Sergeeva

Dual-wavelength fluorescence monitoring of PDT: translating into clinic..... 13

Marina K Kuimova

Mapping microscopic viscosity and temperature using molecular rotors 14

João L. Lagarto

Assessment of colorectal cancer by fiber-based autofluorescence lifetime imaging 15

Ammasi Periasamy

Two-photon FLIRR Microscopy to Investigate the Change in Metabolism in Prostate Cancer Cells... 16

J. Popp

Biophotonics together with AI to tackle medical challenges 17

Peter T. C. So

High throughput multiphoton DEEP imaging based on 3D patterning..... 18

V.V. Tuchin

Tissue optical clearing: prospects for *in vivo* applications 19

Vladislav V. Yakovlev

When time matters..... 20

A.A. Абидуллина, Н.И. Игнатова, В.В. Елагин

Применение верапамила для повышения эффективности противомикробной фотодинамической инактивации 21

В.С. Андреев, П.В. Морозов, М.А. Яковлева, А.А. Костюков, Г.Н. Гольцман

Исследование суспензии липофусциновых гранул методом FLIM с использованием однофотонного детектора..... 22

К.А. Ачкасова, Л.С. Кухнина, А.А. Мусеев, А.В. Полозова, Н.Д. Гладкова

Обнаружение радиационно-индуцированных изменений белого вещества головного мозга методом оптической когерентной томографии 23

Д.Ф. Багаева, С.М. Бухалович, А.Д. Власова, А.А. Громова, А.П. Полякова, Н.А. Бондарев, Н.С. Ильинский, Ф.М. Цыбров, Горделий В.И.

Использование оптогенетического подхода для исследований в области клеточной физиологии .
..... 24

М.В. Багрянцев, Е.Б. Киселева, М.Г. Рябков, А.А. Редькин, В.И. Щеславский

Особенности флуоресцентного профиля кофактора НАД(Ф)Н в слизистой оболочке кишечника на границе резекции у пациентов с колоректальным раком 25

В.А. Байгильдин, Ю.Р. Шакирова, С.П. Туник

Двойной внутриклеточный FLIM/PLIM сенсор на pH и уровень кислорода 26

Д.С. Билан, Е.С. Потехина, А.Г. Шохина, В.В. Белоусов, А.А. Ланин

Интравитальная мультимодальная микроскопия ткани при окислительном стрессе 27

М.С. Бирин, К.Ю. Гузенко, В.В. Елагин, Н.И. Игнатова

Фотодинамическая инактивация грибов *Candida albicans* 28

Л.Н. Бочкарев, Ю.П. Паршина, А.Д. Комарова, П.О. Бабер, М.В. Ширманова, В.И. Щеславский

Фосфоресцентные полимерные комплексы иридия(III) для биомедицинских исследований 29

Ж.В. Бочкова, Э.И. Никельшпарг, А.А. Байжуманов, В.Г. Гривенникова, А.А. Семёнова, С.М. Новиков, В.С. Волков, А.В. Арсенин, Д.И. Якубовски, А.В. Евлюхин, Е.А. Гудилин, Г.В. Максимов, О. Сосновцева, А.Б. Рубин, Н.А. Браже

SERS-зависимое изучение изменений конформации гема цитохрома С при модуляции активности дыхательной цепи митохондрий 30

Н.А. Браже, К.И. Морозова, А.Б. Тяглик, А.А. Федотова, А.Р. Браже, М.С. Шестопалова, Ю.В. Храмова, А.В. Залыгин, А.А. Быков, А.Ю. Белых, А.А. Корнеева, Г.Н. Мартынов, В.А. Олейников, Д.С. Билан, А.В. Семьянов

Изучение редокс-состояния митохондрий астроцитов и нейронов мозга *in vivo* при помощи микроспектроскопии комбинационного рассеяния 31

Д.С. Буркатовский, А.О. Богородский, В.И. Борщевский

Исследование внутриклеточного транспорта TERT методом флуоресцентной микроскопии 32

М.И. Васильева, Д.А. Назаровская, Н.В. Первушин, Ж.В. Самсонова, Л.А. Осминкина

Диагностика эффективности доставки лекарств в раковые клетки методом гигантского комбинационного рассеяния 33

<i>Д.А. Войтович, А.А. Курников, А.Г. Орлова, Л.Е. Шимолина, А.Д. Комарова, М.В. Ширманова, П.В. Субочев</i> Лазерная освещенность в оптоакустической микроскопии оптического разрешения.....	34
<i>С.В. Гамаюнов</i> Оптические методы для планирования и мониторинга ФДТ.....	35
<i>И.А. Горбунова, Д.А. Волков, Д.В. Яшков, М.Э. Сасин, О.С. Васютинский</i> Поляризационная время-разрешенная лазерная спектроскопия флуоресцентных эндогенных молекулярных зондов.....	36
<i>Д.А. Горин</i> Мультимодальные контрастные агенты: технология получения, свойства, биомедицинские применения.....	37
<i>И.Н. Дружкова, Е.Э. Никонова, А.Д. Комарова, А.М. Можеров, Н.И. Игнатова, И.Г. Корякина, М.В. Зюзин, В.А. Байгильдин, Ю.Р. Шакирова, У.А. Лисица, Е.А. Шишин, В.И. Щеславский, С.П. Туник, М.В. Ширманова</i> Мониторинг ответа опухолевых клеток на химиотерапевтическое воздействие в присутствии коллагена с помощью комбинации оптических методов	38
<i>А.В. Дунаев</i> Флуоресцентная спектроскопия кожи человека: возможности и ограничения	39
<i>О.Г. Заборская, О.М. Широкова, И.В. Мухина</i> Использование программных методов анализа конфокальных изображений микроглии в гиппокампе мышей при системном воспалении и физиологическом старении.....	40
<i>Н.В. Злобина, П.С. Церегородцева, Г.С. Будылин, Л.С. Урусова, И.В. Ким, Э.Э. Порубаева, А.В. Воротников, Н.В. Пачуашвили, Н.Г. Мокрышева, Е.А. Шишин</i> Интраоперационная диагностика околощитовидных желез методами оптической спектроскопии с применением оптоволоконного зонда	41
<i>М.В. Зюзин, Е.Н. Герасимова</i> Резонансные диэлектрические наночастицы для оптического нагрева и термометрии в клетках ..	42
<i>А.В. Кашина, А.С. Каширина, Э.Б. Дашинимаев, Е.П. Калабушева, П.С. Ермакова, С.А. Родимова, Д.С. Кузнецова, Н.В. Бобров, В.Е. Загайнов, Е.В. Загайнова</i> FLIM для трансляционных исследований в регенеративной медицине	43
<i>Д.А. Козодаев, М.А. Трусов</i> Лазерная, микроспектральная, и мультифотонная техника для современных исследований в биофизике и биомедицине, в области конфокальной оптики и спектроскопии, включая эксперименты высокого разрешения	44

А.Д. Комарова, С.Д. Синюшкина, Л.Н. Бочкарев, И.Н. Дружкова, В.И. Щеславский, М.В. Ширманова

Комплексная оценка метаболизма и оксигенации опухолей методами время-разрешенного оптического имиджинга..... 45

А.И. Костюк, А.Д. Сергеева, Ю.В. Храмова, В.А. Катруха, В.В. Чебаненко, А.Е. Носова, Н.А. Петрунина, Л.Л. Наумов, К.В. Васильева, М.С. Почечуев, А.С. Чеботарев, А.А. Ланин, И.В. Федотов, А.Б. Федотов, А.Б. Тяглик, А.А. Федотова, К.И. Морозова, А.В. Семьянов, Н.А. Браже, В.В. Белоусов, Д.С. Билан

Генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры для *in vivo* 46

А.А. Красновский мл.

Фотосенсибилизированная люминесценция синглетного молекулярного кислорода: история открытия, механизмы, методы измерения, аналитические и биомедицинские применения..... 47

Я.О. Кудряшова, Д.А. Назаровская, Я.В. Ломовская, А.А. Кудрявцев, Л.А. Осминкина

Спектроскопия комбинационного рассеяния света для изучения биodeградации германиевых наночастиц..... 48

Е.А. Кузюнова, У.А. Близнюк, А.П. Черняев, П.Ю. Борщеговская, И.А. Родин, М.И. Торопыгина, А.П. Козлов, Е.К. Козлова

Изменение форм миоглобина в результате развития окислительных процессов под действием ультрафиолета..... 49

А.А. Курников, А.Г. Санин, А.М. Глявина, А.Г. Орлова, Г.П. Волков, А.В. Ковальчук, Д. Рязанский, П.В. Субочев

Пьезополимерные PVDF-TrFE детекторы для сканирующей оптоакустической ангиографии экспериментальных новообразований..... 50

Л.С. Кухнина, К.А. Ачкасова, Е.Б. Киселева, А.Л. Потапов, А.А. Моисеев, Н.Д. Гладкова

Использование коэффициента затухания для оценки морфологического статуса перитуморального белого вещества при глиомах различной степени злокачественности 51

П.В. Морозов, В.С. Андреев, В.И. Щеславский, В. Бекер, Г.Н. Гольцман

Прямое измерение времен жизни фосфоресценции синглетного кислорода с использованием сверхпроводникового однофотонного детектора..... 52

А.А. Мосунов, П.А. Мутовкин, И.И. Ращенкова

Спектроскопическое исследование культуры клеток HeLa 53

А.В. Наумов

Флуоресцентная наноскопия: от детектирования одиночных молекул к биомедицине и квантовым технологиям..... 54

М.П. Никитин, Е.С. Коренков, А.В. Литвиненко, М.А. Юрченко, Д.А. Маэди, В.В. Леванович, А.В. Пушкарев

Новые оптические методы исследований *in vitro* и *in vivo* на основе инновационных приборов российского производства 56

Л.А. Осминкина

Фотолюминесцентная микроскопия и комбинационное рассеяние света для анализа наноконтейнеров на основе пористого кремния в биологических системах 57

О.О. Павлов, Б.П. Якимов, Д.Д. Лысухин, Е.А. Шишин

Многоклассовая классификация микроорганизмов с использованием данных оптического отклика 58

Е.В. Панферов, И.М. Спивак, Н.И. Тапильская, Р.И. Глушаков

Визуализация Mitotracker Orange CMTMRos при помощи FLIM для оценки состояния митохондрий 59

А.А. Плеханов, М.М. Логинова, Е.А. Аветисян, А.А. Шепелева, А.А. Советский, А.А. Моисеев, М.М. Карабут, С.В. Гамаюнов, Г.В. Геликонов, Г.О. Гречканев, М.А. Сироткина, В.Ю. Зайцев, Н.Д. Гладкова

Мультимодальная ОКТ-диагностика патологий тела матки 60

Д.В. Поминова, А.В. Рябова, И.Д. Романишкин, И.В. Маркова, А.С. Скобельцин

Влияние фотодинамической терапии с метиленовым синим и хлорином еб на метаболизм опухоли *in vivo* на мышинных моделях 61

А.Л. Потапов, М.М. Логинова, А.А. Моисеев, И.А. Кузнецова, Н.Д. Гладкова, М.А. Сироткина, С.Г. Раденска-Лоповок

Коэффициент затухания ОКТ сигнала с разрешением по глубине для оценки степени поражения дермы при раннем Склерозирующем лишене вульвы 62

Е.В. Потапова

Интраоперационная флуоресцентная диагностика *in vivo* 63

С.А. Родимова, В.В. Елагин, А.М. Можеров, И.Д. Щечкин, Д.П. Крылов, Д.С. Козлов, А.И. Гаврина, Н.В. Бобров, В.Е. Загайнов, Е.В. Загайнова, Д.С. Кузнецова

Оптические признаки снижения регенераторного потенциала печени при патологии 64

А.В. Рябова, И.Д. Романишкин, И.В. Маркова, Д.В. Поминова

Влияние метиленового синего на клеточный метаболизм и сенсibilизацию вторым фотосенсibilизатором хлорином еб 65

М.М. Сажина, А.В. Изосимова, Д.А. Сачкова, И.С. Шумская, А.М. Можеров, В.И. Щеславский, М.В. Ширманова, Д.В. Южакова

Особенности автофлуоресцентного профиля периферических лимфоцитов пациентов с меланомой по сравнению со здоровыми донорами 66

Д.А. Сачкова, Е.Б. Киселева, Е.Л. Бедерина, А.С. Гришин, В.И. Щеславский, Л.С. Кухнина, М.В. Ширманова, К.С. Яшин

Оценка автофлуоресцентных характеристик глиальных опухолей пациентов ex vivo методом FLIM-макроимиджинга для разработки подхода оптической биопсии глиом..... 67

Ю.И. Светлова, В.В. Северов, Е.К. Книжник, В.А. Долгушева, П.В. Рубцов, А.М. Варижук, А.А. Аралов, Т.С. Ведехина

Система для внутрисклеточного имиджинга РНК-белковых конденсат..... 68

А.Ю. Сосорев, О.Д. Паращук, А.А. Трубицын, О.Г. Харланов, И.В. Чичерин, Н.О. Дубинец, П.А. Каменский, Д.Ю. Паращук

Оценка степени компактизации ДНК и РНК с помощью низкочастотной спектроскопии комбинационного рассеяния 69

В.В. Терехова, Д.В. Бодунова, Е.С. Горохов, С.В. Сидоренко, Р.А. Васильев, С.А. Левицкий, Ю.А. Богданова, М.С. Баранов, Е.Г. Максимов

Рациональный дизайн генетически кодируемых флуорофоров за счет трансляционного введения канонических и неканонических аминокислот 70

И.В. Турчин, В.В. Перекатова, А.Б. Костюк, А.Г. Орлова, А.В. Хилов, Е.А. Сергеева, К.А. Былинская, М.Ю. Кириллин

Оптическая диффузионная спектроскопия биотканей и ее применение в биомедицинских задачах 71

А.Э. Хлынова, Л.Е. Шимолина, А.М. Можеров, М.К. Куимова, М.В. Ширманова

Визуализация изменений микровязкости мембран опухолевых клеток HeLa при ФДТ с использованием FLIM микроскопии и молекулярных роторов..... 72

Л.О. Целых, А.В. Орлова, Д.С. Кошелев, В.В. Уточникова

Новые ИК излучающие комплексы лантанидов..... 73

Н.Ю. Шилягина, Л.Н. Шестакова, С.А. Лермонтова, Т.С. Любова, Л.Г. Клашина, И.В. Балалаева

Цианоарилпорфиразины: перспективные мультифункциональные агенты для персонализированной фотодинамической терапии..... 74

М.В. Ширманова, Л.Е. Шимолина, В.В. Елагин, А.Э. Хлынова, М.А. Сироткина, Н.И. Игнатова, А.А. Плеханов, П.А. Буреев, В.И. Щеславский, М.М. Лукина, Е.В. Загайнова

FLIM и PLIM в исследовании биологических эффектов фотодинамической терапии опухолей 75

А.А. Ширяев, М.П. Иванков, А.В. Войтова, Н.А. Калягина, К.Т. Эфендиев, А.М. Удинев, А.В. Алехнович, И.В. Решетов, В.Б. Лощёнов

Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия (фототераностика) антибиотикорезистентных огнестрельных ран..... 76

Д.В. Южакова, А.В. Изосимова, М.М. Сажина, Д.А. Сачкова, И.С. Шумская, К.С. Яшин, А.М. Можеров, В.И. Щеславский, М.В. Ширманова

Автофлуоресцентный метаболический профиль лимфоцитов как потенциальный предиктор эффективности иммунотерапии 77

Е.В. Юшкова, Н.А. Подоплелова, Д.В. Федорова, А.Л. Хорева, А.Ю. Щербина, П.А. Жарков, М.А. Пантелеев

Иммунофлуоресцентная микроскопия мазков крови для диагностики нарушений тромбоцитов 78

К.С. Яшин, Е.Б. Киселева, К.А. Ачкасова, Д.С. Сачкова, А.С. Гришин, М.В. Ширманова, В.Ю. Щеславский, Н.Д. Гладкова

Применение методов оптического биоимиджинга в хирургии опухолей головного мозга..... 79

Quantitative Metabolic Imaging by NAD(P)H / FAD FLIM

Wolfgang Becker
Becker&Hickl GmbH, Berlin, Germany

Detection of the metabolic state of cells and tissues is the basis of spectroscopic diagnosis of tumor diseases. The metabolic state is directly reflected by the fluorescence-decay parameters of NAD(P)H and FAD. The primary information is in the amplitudes of the decay components of the multi-exponential decay functions, not in the apparent fluorescence lifetime of a single-exponential approximation. Detecting the amplitudes requires a FLIM technique that records the decay functions at

high photon efficiency, high resolution and into a large number of time bins, and an analysis technique that is able to efficiently split the decay functions into their exponential components. We show that TCSPC FLIM in combination with Maximum-Likelihood-Estimation (MLE) is perfectly able to do that. We demonstrate metabolic FLIM for a number of typical applications, such as FLIM-based histology, detection of tumor borders, and examination of tissue excised in tumor surgery.

Norm and pathology predictions: Vasculature changes ML-based clustering of optoacoustic imaging segmented data

Z.V. Besedovskaia¹, A.Yu. Korobov^{1,2}, D.A. Ushakov^{3,4}, N.I. Kudriashova¹, M. Trofimov¹, S.V. Nemirova⁵, A.G. Orlova², P.V. Subochev²

¹Skolkovo Institute of Science and Technology, Skoltech, Moscow, Russia

²Ultrasonic and Opto-Acoustic Diagnostics Laboratory, Institute of Applied Physics RAS, IAP RAS, Nizhny Novgorod, Russia

³Schmidt Institute of Physics of the Earth, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴Earth Physics Chair, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵Privolzhsky Research Medical University, PRMU, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract — Visualization of vascular pathologies in the early stages of disease is extremely important for the successful therapy selection. An array of imaging methods of peripheral vascular bed can derive differential topological features for individual pathologies. Optoacoustic angiograms are among the most versatile and are well suited for deriving significant differential criteria for vascular diagnostics.

Keywords — *optoacoustic; angiography; CVI, CAI, diabetes, ML; classification; 3D visualization*

INTRODUCTION

In the early stages of various pathologies secondary peripheral vascular bed disorders are often overlooked when choosing therapy course. Deep understanding of vascular abnormalities is essential for recommending effective treatments as well as early diagnostics of certain pathological states. Currently, the state of the vascular bed in patients with various pathologies (i.e. diabetes mellitus) is mostly evaluated using ultrasound diagnostic imaging (USI).

However, USI has certain limitations, for one, its resolution is not suitable for detecting small peripheral vessel changes. A good alternative method for vascular imaging is optoacoustics (OA), which can greatly improve the resolution and quality of the resulting images. The images obtained by OA are subject to various methods of computational processing, among which ML models occupy a significant share¹.

RESULTS

To differentiate between pathological and normal data, we used various classifiers applied before and after PCA dimensionality reduction of our datasets, as well as classifiers based on the ML structure for datasets without dimensionality reduction. Datasets were obtained using SKYQUANT 3D tool².

Two types of vessel segment features datasets were used for analysis (1 - classification of norm and pathology; 2 - classification of each individual pathology). As a result, we obtained differentiation between norm and pathology with high accuracy (Fig. 1) both for a simple classifier after PCA dimensionality reduction and for classifiers using machine learning (Table 1).

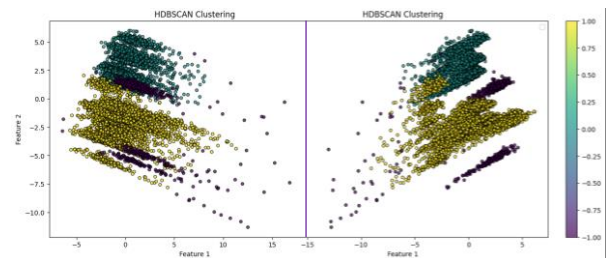


FIG. 1. NORM / PATHOLOGY CLUSTERIZATION WITH HDBSCAN WITH VESSEL SEGMENTS DATASET: EACH ROW CONTAINES 9 SEGMENT SPECIFIC FEATURES AND EACH DATASET CONTAINES AT LEAST 10000 ROWS. CLUSTERING IS PERFORMED AFTER PCA DIMENTIONALITY REDUCTION.

TABLE
1

NORM / PATHOLOGY ML-BASED CLASSIFICATION

Classifier	Score				
	Accuracy	Precision	Recall	F1-score	Roc-Auc
Catboost	0.898	0.899	0.898	0.894	0.965
SDGClassifier	0.912	0.871	0.874	0.887	0.882

ACKNOWLEDGMENT

Authors would like to acknowledge the technical contributions of M.Prudnikov, A.Kovalchuk, R.Kobzev, and V.Vorobyev from IAP RAS.

REFERENCES

- [1] Karlas, A. et al. Dermal features derived from optoacoustic tomograms via machine learning correlate microangiopathy phenotypes with diabetes stage. *Nat. Biomed. Eng* 7, 1667–1682 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41551-023-01151-w>
- [2] Korobov A. et al., " Quantifying Anatomy of Vascular Structures: An Open-source Workflow for Comprehensive Analysis of 3D Angiographic Data Acquired Using Optoacoustic Imaging," Github repository (2023), <https://github.com/KAY-imaging/OA-pipeline>

Delineation of Fresh Gastrointestinal Tumor Biopsies Using a Fiber-based Fluorescence Lifetime Imaging Probe

Riccardo Cicchi

National Institute of Optics - National Research Council (CNR-INO), Florence, Italy

Autofluorescence spectroscopy has emerged in recent years as a powerful tool to report label-free contrast between normal and diseased tissues. In particular, Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) has shown detailed profiles of tissue autofluorescence, enabling more informed and rapid tissue characterization, with the potential for translation from the research labs to bedside. We report here the test of our autofluorescence lifetime imaging probe device on four different clinical cases. More in detail, we examined four

biopsies, one from a hepatocellular carcinoma (HCC), another from an intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC), one from a gastrointestinal stromal tumor (GIST) and the last one from pancreatic ductal adenocarcinoma (PDCA). The results suggest that our autofluorescence lifetime imaging probe, together with phasor analysis, can offer a real-time tool to observe spectral and lifetime contrast on fresh tissues and, thus, is a suitable candidate for improving in situ tissue diagnostics during surgery.

Dual-wavelength fluorescence monitoring of PDT: translating into clinic

M. Kirillin¹, D. Kurakina¹, A. Khilov¹, M. Shakhova^{1,2}, V. Perekatova¹, N. Shishkova¹, A. Mironycheva^{1,2},
A. Malygina², I. Shlivko², N. Orlinskaya², S. Gamayunov^{1,3}, I. Turchin¹, E. Sergeeva¹
¹A.V. Gaponov-Grekhov Institute of Applied Physics RAS, Nizhny Novgorod, Russia
²Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia
³Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncology Center, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract — Dual-wavelength fluorescence imaging, providing estimation of photosensitizers localization depth owing to difference in optical properties of biotissues in red and blue bands, is discussed.

Keywords — photodynamic therapy, fluorescence imaging, chlorin-based photosensitizers

I. INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) is a modern treatment modality efficient against a wide spectrum of pathologies. The treatment mechanism is based on target delivery of photosensitizer (PS) followed by its activation by light illumination. Photodynamic reaction induced by the light leads to local production of reactive oxygen species which lead to abnormal cells death. Since photosensitizers usually exhibit pronounced fluorescence excited by the visible light, fluorescence techniques are employed as a convenient tool for monitoring of PS accumulation and photobleaching. Strong dispersion of biotissue optical properties in the visible range inspires consecutive multi-wavelength fluorescence excitation with collecting fluorescence signals from different depths within biotissue allowing for fast evaluation of PS localization depth [1,2]. This effect is successfully employed in monitoring chlorin-based PSs featuring absorption peaks in red and blue bands of visible spectra. The ratio of fluorescence signals excited with red and blue light is employed as a measure for PS localization depth. In this paper we review the basics and the models that lie in the principles of dual-wavelength fluorescence imaging and report on its clinical applications.

II. MATERIALS AND METHODS

Dual-wavelength monitoring of PDT was performed using a home-built device developed at the Institute of Applied Physics RAS. The device is equipped with two sources ensuring consecutive wide-field illumination of the studied object at wavelengths of 660 nm and 405 nm. The fluorescence emission is detected using a CCD-camera with filter allowing to avoid the effect of the probing radiation on the registered spatial distribution of fluorescence emission. Estimation of fluorophore localization depth based on fluorescence images acquired at two excitation wavelength is performed using the analytical model reported in [1] verified in experiment with

monitoring of PDT treatment of basal cell carcinoma performed with chlorin-based PS Fotoditazin (Veta-Grand Ltd., Russia) with irradiation at 662 nm with the total light dose delivered to tissue surface of 150 J/cm². The studies were approved by the Ethics Committee of Privolzhsky Research Medical University (Protocol #13, 4 July 2019).

III. RESULTS

The monitoring of a PDT included three periods: PS accumulation prior to the procedure (about 2 hours), irradiation, and long-term follow up (up to 48 hours). Initial stage of PS accumulation demonstrates increase in fluorescence signal at both probing wavelengths associated with increase in PS concentration. The irradiation stage is characterized by the decrease of fluorescence signal associated with photobleaching. The beginning of the follow-up period demonstrates an increase in fluorescence signal level associated with activation of microcirculatory activity as a result of the irradiation, however, this signal drops down in approximately 24 hours indicating blood flow arrest due to PDT vascular mechanism. In the last case, fluorescence imaging serves as a marker of circulatory activity.

Estimation of PS localization depth along with fluorescence imaging allows to evaluate the impact of the procedure: its decrease indicates penetration of PS from blood to superficial tissue layers, while its increase as a result of PDT procedure indicates primary action to superficial layers and/or prevalence of the PS delivery to deeper layers with blood flow.

Thus, dual wavelength fluorescence monitoring serves as a complementary tool for detailed control of PDT treatment and also provides fast and non-invasive estimation of functional tissue response.

REFERENCES

- [1] M. Kirillin, A. Khilov, D. Kurakina, A. Orlova, V. Perekatova, V. Shishkova, A. Malygina, A. Mironycheva, I. Shlivko, S. Gamayunov, I. Turchin, E. Sergeeva. "Dual-wavelength fluorescence monitoring of photodynamic therapy: from analytical models to clinical studies". *Cancers*, vol. 13, pp. 5807, 2021.
- [2] A.V. Khilov, E.A. Sergeeva, D.A. Kurakina, I.V. Turchin, M.Yu. Kirillin "Analytical model of fluorescence intensity for the estimation of fluorophore localisation in biotissue with dual-wavelength fluorescence imaging", *Quantum Electronics*, **51** (2), 95–103 (2021)
- [3] A.V. Khilov, V.A. Shishkova, E.A. Sergeeva, D.A. Kurakina, M.Y. Kirillin, Agar phantoms of biological tissue for fluorescence monitoring of photodynamic therapy, *Quantum Electronics* **52** (1), 63-68 (2022)

The study is supported by the Russian Science Foundation (project 24-15-00175), <https://rscf.ru/en/project/24-15-00175/>.

phantoms [1,3]. Dual-wavelength technique was employed for

Mapping microscopic viscosity and temperature using molecular rotors

Marina K Kuimova

Imperial College London, Chemistry Department, London, UK

Viscosity is one of the main factors which influence diffusion in condensed media. In a cell viscosity can play a role in several diffusion mediated processes, such as drug delivery, signalling and mass transport. Previously, alterations in viscosity in cells and organs have been linked to malfunction; however, mapping viscosity on a single-cell scale remains a challenge.

We have imaged viscosity and crowding inside lipid mono- and bi-layers, in cells and in vivo using fluorescent probes, called molecular rotors.^{1, 2} In molecular rotors the speed of rotation about a sterically hindered bond is viscosity-dependent, which strongly affects fluorescence lifetime or spectra of rotors, allowing fluorescence imaging. This approach enabled us to

measure both the microscopic viscosity and temperature^{2, 3} as well as the presence of unusual DNA topologies, G-quadruplexes,⁴⁻⁶ and monitor their temporal changes in real time. The talk will cover our recent developments of this technique, such as genetic and passive targeting of rotors and applications to monitoring disease.

REFERENCES

- [1] M. Paez-Perez, M. K. Kuimova, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2024, 63, e20231123
- [2] A. Vyšniauskas *et al*, *Int. Rev. Phys. Chem.* 2018, 37:2, 259
- [3] A. Vyšniauskas, *et al*, *Chem. Sci.*, 2015, 6, 5773
- [4] A. Shivalingam, *et al Nat. Commun.*, 2015, 6, 8178
- [5] P. A. Summers, B. W. Lewis, *et al Nat. Commun.* 2021, 12, 162
- [6] J. Robinson *et al*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2024, 146, 1, 1009

Assessment of colorectal cancer by fiber-based autofluorescence lifetime imaging

João L. Lagarto

Biophotonics Platform, Champalimaud Foundation, Lisbon, Portugal

Colorectal cancer (CRC) ranks among the most prevalent malignancies worldwide, driving the quest for comprehensive, label-free characterization methods. Among these, multidimensional autofluorescence lifetime imaging has proven to provide quantitative and objective information, assisting in real-time clinical evaluations and ultimately improving the accuracy and effectiveness of diagnostic and therapeutic interventions. Here, we present a clinically viable fiber-based autofluorescence lifetime imaging system employing Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) for fast, multiparametric macroscopic characterization of tissues. We demonstrate its utility in characterizing colorectal cancer surgical specimens obtained from over 150 patients. Autofluorescence-derived parameters from normal tissues, adenomatous lesions, and adenocarcinomas were analyzed in

relation to underlying clinicopathological features. Our results indicate that tissue differences are primarily driven by collagen and flavins autofluorescence parameters, with changes in NAD(P)H autofluorescence suggesting intratumoral heterogeneity and distinct metabolic subpopulations. Autofluorescence signatures also varied with lymphatic and venous invasion, differentiation grade, microsatellite instability, and radiative treatment in rectal tissues. To further highlight the clinical viability of this system, we integrated it with a commercial endoscope, demonstrating its practical implementation. Altogether, this work showcases a viable pathway for the clinical translation of TCSPC-based autofluorescence measurements, with potential to enhance diagnostic and therapeutic interventions.

Two-photon FLIRR Microscopy to Investigate the Change in Metabolism in Prostate Cancer Cells

Ammasi Periasamy

WM Keck Center for Cellular Imaging, Departments of Biology and Biomedical Engineering, University of Virginia,
Charlottesville, Virginia, USA

The cellular reduction/oxidation (REDOX) states of non-invasive measurements, has grown exponentially since the seminal work by Chance in the 1960's exploiting the auto-fluorescent properties of the coenzymes NADH and FAD. The intensity-based methods were expanded followed by Fluorescence lifetime imaging (FLIM) assays to monitor REDOX changes as markers for changed metabolic states. These FLIM assays are of particular interest in measuring responses to treatment in various cancer pathologies, cancer being a metabolically heterogeneous pathology, being able to generate energy by oxidative phosphorylation (OXPHOS) and by glycolysis. Furthermore, using whole-cell average data for redox levels does not capture subtle and changing differences

between heterogeneous individual cells, between cytosolic glycolysis and mitochondrial OXPHOS and intra-cellular gradients. Instead, we developed a two-photon FLIRR (fluorescence lifetime redox ratio) microscopy which is based entirely on two-photon lifetime measurements, unaffected by intensity artefacts, isolates individually segmented cell data and separates intra-cellular OXPHOS and glycolysis data. The newly developed FLIRR approach helps to monitor the drug response in live prostate cancer (PCa) cells. We have demonstrated a FLIM imaging protocol using a single wavelength excitation (800 nm) for prostate cancer (PCa) cells, allowing simultaneous image acquisition of NADH and FAD to monitor the drug response.

Biophotonics together with AI to tackle medical challenges

J. Popp

¹Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Friedrich-Schiller-University Jena, Jena, Germany

²Leibniz Institute of Photonic Technology, Member of Leibniz Health Technologies, Jena, Germany

This work demonstrates the successful integration of biophotonic approaches with AI-based data analysis into routine clinical applications, particularly for intraoperative tumour diagnosis and on-site infectious disease diagnosis and treatment. The rising incidence of cancer and infectious diseases demands early diagnosis and personalised therapy. Spectroscopic methods, especially Raman spectroscopy, are a highly promising avenue for providing clinically relevant information that can help address these medical challenges. This contribution presents cutting-edge multi-contrast spectroscopy techniques for precise intraoperative tumour margin control and reliable tumour typing, enabling the initiation of individualised therapy. Furthermore, it is crucial to determine the immune response, identify pathogens and their resistance patterns, and monitor treatment response to ensure successful infection management. We introduce translational infrastructures to bridge the gap between research and clinical implementation, ensuring swift patient access to these advancements.

Acknowledgements

Financial support of the EU, the "Thüringer Ministerium für Wirtschaft, Wissenschaft und Digitale Gesellschaft", the "Thüringer Aufbaubank", the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF), the German Science Foundation, the Fonds der Chemischen Industrie and the Carl Zeiss Stiftung.



Juergen Popp holds a chair for Physical Chemistry at the Friedrich-Schiller University Jena, Germany. Since 2006 he is also the scientific director of the Leibniz Institute of Photonic Technology, Jena. Juergen Popp is a world leading expert in Biophotonic / optical health technology research covering the complete range from photonic basic research towards translation into clinically applicable methods. He has published more than 1000 journal papers. He received several awards like e.g. two honorary doctorate degree: 2012 from the Babes-Bolyai University in Cluj-Napoca, Romania and very recently 2023 from the University at Albany – State University of New York (USA).

High throughput multiphoton DEEP imaging based on 3D patterning

Peter T. C. So

Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA

The use of structured light for microscopic imaging has nearly a century long history. Recent important applications include attaining resolution beyond diffraction limit and imaging structures at a selective depth. We have recently developed De-scattering with Excitation Patterning or "DEEP," an extension of TRAFFIX approach developed by Dholakia group. DEEP allows high throughput depth selective wide-field multiphoton imaging in tissues without suffering from blurring due to the scattering of emission photons. Importantly, the combination of DEEP with modern computational approaches offers even faster

imaging opportunities for specimens that can be sampled compressively. We are exploring extensions of this approach along several directions including to simultaneously reconstruct 3D volumes and to combine lifetime imaging to increase information content. In both cases, the extension to a higher dimensional measurement space allows better utilization of the inherent sparsity in many samples allowing for even higher efficiency. An application of these approaches is the in vivo mapping of neuronal connectivity.

Tissue optical clearing: prospects for *in vivo* applications

V.V. Tuchin

Institute of Physics and Science Medical Center, Saratov State University, Saratov, Russia
Institute of Precision Mechanics and Control, FRS "Saratov Scientific Centre of the RAS", Saratov, Russia
Laboratory of Laser Molecular Imaging and Machine Learning, Tomsk State University, Tomsk, Russia

Abstract — Advances of the tissue optical clearing method for solving problems of intravital optical imaging and diagnostics are discussed.

Keywords — *tissue optics; optical imaging techniques; fluorescence; immersion optical clearing*

I. INTRODUCTION

Tissue optical clearing (TOC) is based on the temporary and reversible suppression of tissue light scattering using biocompatible immersion optical clearing agents (OCAs) [1-5]. Delivery of the appropriate OCA into living tissue ensures its transient transparency over a wide spectral range from deep UV to NIR, providing high imaging depth and contrast for a variety of optical modalities, including single- and multiphoton fluorescence.

II. TISSUE OPTICAL CLEARING

The presentation summarizes the latest advances in the development of the TOC method for solving problems of intravital optical imaging and diagnostics. In addition to increasing optical transparency, studying the kinetic properties of tissue transparency under the influence of OCA probe molecules makes it possible to reliably differentiate between healthy and pathological tissues and quantify drug delivery mechanisms, as well as combine optical technologies with traditional imaging methods such as ultrasound, CT and MRI.

III. CONCLUSION: BENEFITS OF THE METHOD

Tissue optical clearing technology is useful for advanced multimodal spectroscopy/imaging and light therapy.

The efficiency of biomedical optical spectroscopy/imaging techniques operating over a wide range of wavelengths from the deep UV to the terahertz range can be significantly improved.

The combination of optical techniques such as Raman, OCT, FLIM, MPM, SHG, photoacoustic, diffuse reflectance and terahertz imaging with X-ray CT and MRI is possible through the use of commercial contrast agents.

The optical clearing method provides additional markers for monitoring diabetes mellitus complications and cancer detection.

The technique of tissue optical clearing gives important data for optimal cryopreservation of organs.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by grant of the Russian Science Foundation # 23-14-00287.

REFERENCES

- [1] L. Oliveira and V.V. Tuchin, The Optical Clearing Method: A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering, Springer Nature Switzerland AG: Basel, 2019, 177 p.
- [2] V.V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina (Eds.), Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging, Taylor & Francis Group LLC, CRC Press: Boca Raton, FL, 2022, 688 p.
- [3] V.V. Tuchin, E.A. Genina, E.S. Tuchina, A.V. Svetlakova, and Y.I. Svenskaya, "Optical clearing of tissues: issues of antimicrobial phototherapy and drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 180, 114037, January 2022.
- [4] I.S. Martins, H.F. Silva, E.N. Lazareva, N.V. Chernomyrdin, K.I. Zaytsev, L.M. Oliveira, and V.V. Tuchin, "Measurement of tissue optical properties in a wide spectral range: a review [Invited]," *Biomedical Optics Express*, vol. 14, pp. 249-298, January 2023.
- [5] A.S. Shanshool, S. Ziaee, M.A. Ansari, and V.V. Tuchin, "Advances in the transport of laser radiation to the brain with optical clearing: From simulation to reality (Invited Review)," *Progress in Quantum Electronics*, vol. 94, 100506, 2024.

When time matters

Vladislav V. Yakovlev
Department of Biomedical Engineering
Department of Electrical and Computer Engineering
Department of Physics and Astronomy
Texas A&M University

Biological imaging strives to achieve label free microscopic and nanoscopic chemical imaging in minimally invasive way. While our recent work [1] showed a remarkable sensitivity of Raman spectroscopy to achieve unprecedented sensitivity to molecular structure and function, the strict conditions at which those type of measurements need to be performed potentially limit applications of such approach to live cell imaging.

In my talk, I present a series of new developments in microscopic imaging where molecular dynamics serves as a powerful contrast mechanism for optical imaging. Inspired by fluorescence lifetime imaging [2], we extend this approach to Raman microspectroscopy [3-4] and to fluorescence imaging of weakly fluorescent molecules.

REFERENCES

- [1] N. Altangerel, et al, "Label-free drug interaction screening via Raman microscopy," Proceedings of the National Academy of Sciences USA 120(30), e2218826120 (2023).
- [2] E. A. Shirshin, et al, "Label-free sensing of cells with fluorescence lifetime imaging: The quest for metabolic heterogeneity," Proceedings of the National Academy of Sciences USA 119 (9), e2118241119 (2022).
- [3] H. Zhu, B. Chen, V. V. Yakovlev, D. Zhang, "Time-resolved vibrational dynamics: Novel opportunities for sensing and imaging," Talanta 266(Part 2) 125046 (2024).
- [4] H. Zhu, C. Xu, V. V. Yakovlev, D. Zhang, "What is cooking in your kitchen: seeing "invisible" with time-resolved coherent anti-Stokes Raman spectroscopy," Analytical and Bioanalytical Chemistry 415(26), 6471-6480 (2023).

Применение верапамила для повышения эффективности противомикробной фотодинамической инактивации

А.А. Абудуллина¹, Н.И. Игнатова^{1,2}, В.В. Елагин²

¹ФГБОУ ВО «ПИМУ» МЗ РФ, кафедра эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины, Нижний Новгород, Россия

²ФГБОУ ВО «ПИМУ» МЗ РФ, НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий, Нижний Новгород, Россия

Аннотация — В условиях растущей антибиотикорезистентности представляется актуальным разработка альтернативных методик борьбы с патогенными микроорганизмами. Одним из вариантов может быть фотодинамическая инактивация (ФДИ), эффективность которой зависит от строения клеточной стенки бактерий. Для повышения эффективности противомикробного действия ФДИ в отношении штаммов *P. aeruginosa* и *Kl. pneumoniae* использовалась предварительная обработка верапамилом. Показано кратное повышение эффективности ФДИ после блокировки работы эффлюксных помп.

Ключевые слова — фотодинамическая инактивация, *P. aeruginosa*, *Kl. pneumoniae*, верапамил, фотодинамическая терапия

I. ВВЕДЕНИЕ

Наиболее распространёнными возбудителями раневых и системных инфекций у пациентов с иммунодефицитами являются *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*. Повсеместное распространение и устойчивость во внешней среде, резистентность возбудителей к антимикробным препаратам затрудняют лечение, что приводит к хронизации инфекционного процесса, а порой и к летальному исходу [1].

Эффективным методом терапии может стать фотодинамическая инактивация (ФДИ), суть которой состоит в активации фотосенсибилизатора светом определенной длины волны, что способствует образованию активных форм кислорода и гибели микроорганизма. Однако, выведение фотосенсибилизатора в результате работы эффлюксных насосов [2] снижает эффективность ФДИ [3]. Таким образом, оптимизация условий проведения ФДИ с учетом активности факторов вирулентности патогенных микроорганизмов представляется актуальной целью.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы *P. aeruginosa*, *Kl. pneumoniae* имеющие гены эффлюксных помп семейств множественного оттока лекарственных средств (суперсемейства RND, SMR, MATE, MFS) были отобраны с помощью полногеномного секвенирования. Сравнивалась эффективность стандартной

ФДИ и ФДИ с предварительной обработкой бактерий верапамилом (ВП, 300мкг/мл, 5 минут). В качестве фотосенсибилизатора использовался фотодитазин (ФС, 50 мкМ, 15 минут). Бактерии облучались диодным лазером с длиной волны 650 нм с выходной мощностью 150 мВт, в течение 10 минут. Затем суспензии пересевали на чашки Петри для дальнейшего подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ).

III. РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении стандартной методики ФДИ показатель логарифмического снижения для штаммов *P. aeruginosa* и *Kl. pneumoniae* соответствовал гибели 90% микроорганизмов. При ФДИ с предварительной обработкой верапамилом достигался полный бактерицидный эффект как для *P. aeruginosa*, так для *Kl. pneumoniae*. Изолированное воздействие ВП и ФС, как и их совместное действие не привело к статистически значимому изменению КОЕ/мл.

IV. ВЫВОДЫ

Показано, что ингибирование эффлюксных помп *P. aeruginosa* и *Kl. pneumoniae* повышает эффективность ФДИ. Результаты могут быть применены для разработки высокоэффективного метода борьбы с микроорганизмами, в том числе, обладающими множественной лекарственной устойчивостью. Преимуществом методики можно считать отсутствие системного действия на макроорганизм и отсутствие формирования резистентности у микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] A. Bandy, F.A. Wani, A.H. Mohammed, U.F. Dar, A. Mallick, M.R. Dar, B.A. Tantry. Bacteriological profile of wound infections and antimicrobial resistance in selected gram-negative bacteria. Afr Health Sci. vol. 22, №4, pp. 576-586. 2022
- [2] A.B. Lorusso, J.A. Carrara, C.D.N. Barroso, F.F. Tuon, H. Faoro. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Mol Sci. vol. 23, №24, pp.1-21. 2022
- [3] N. Ignatova; T. Ivanova, A. Antonyan, I. Budruev, O. Streltsova, V. Elagin, V. Kamensky. Efficacy of Photodynamic Inactivation against the Major Human Antibiotic-Resistant Uropathogens. Photonics. vol 8. pp. 495-506. 2021

Исследование суспензии липофусциновых гранул методом FLIM с использованием однофотонного детектора

В.С. Андреев^{1,2,3}, П.В. Морозов^{2,3}, М.А. Яковлева⁴, А.А. Костюков⁴, Г.Н. Гольцман^{1,2}

¹Высшая школа экономики, НИУ ВШЭ, Москва, Россия

²Московский Педагогический Государственный Университет, МПГУ, Москва, Россия

³Сверхпроводниковые нанотехнологии, ООО «Сконтел», Москва, Россия

⁴Институт Биохимической Физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ИБХФ РАН, Москва, Россия

Аннотация — Настоящая работа посвящена разработке метода анализа на основе современного неинвазивного диагностического метода в офтальмологии – аутофлуоресценции глазного дна (АФ). Исследования проведены с использованием суспензии липофусциновых гранул (ЛГ) из клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ), полученных из кадаверных глаз без признаков патологии. Фотоокисленные липофусциновые гранулы использовали как модель возрастной макулярной дегенерации (ВМД). В качестве метода использовался временно коррелированный счет одиночных фотонов люминесценции и FLIM с использованием сверхпроводникового однофотонного детектора. Были подобраны условия для получения сигнала при возбуждении флуоресценции от исследуемых образцов. Сравнительный анализ времен жизни флуоресценции до и после фотоокисления УФ светом липофусциновых гранул показал достоверные различия характерных времен флуоресценции.

Ключевые слова — сверхпроводниковые детекторы, липофусциновые гранулы, FLIM

I. ВВЕДЕНИЕ

Одной из самых распространенных причин потери зрения у пожилых людей является возрастная макулярная дегенерация сетчатки (ВМД) [1]. В связи с этим особое внимание уделяется разработке методов доклинической неинвазивной диагностики дегенеративных заболеваний сетчатки и ретинального пигментного эпителия (РПЭ), в частности, усовершенствованию и расширению диагностических возможностей уже существующего неинвазивного метода диагностики – аутофлуоресценции глазного дна (АФ) [2].

В данной статье представлена система на основе конфокального микроскопа с лазерным гальвано-сканером для прямого измерения люминесценции с пикосекундным временным разрешением в сочетании со сверхпроводниковым однофотонным детектором (SSPD). Сверхпроводниковый однофотонный детектор открывает такую возможность, т.к. превосходит другие типы однофотонных детекторов в квантовой эффективности, темновом счете и временном разрешении и может быть лучшим решением для многих применений [3].

Работа поддержана грантом РФФ № 23-65-10005.

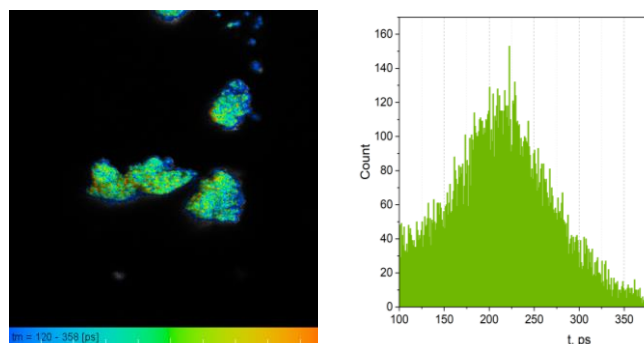


Рис. 1. Время флуоресценции липофусцина, (а) флуоресцентное изображение, (б) гистограмма среднего времени жизни для компонента t_1 .

II. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

При анализе на установке конфокальной микроскопии были получены FLIM изображения и гистограммы распределения времен жизни для каждого пикселя для каждой из трех компонент времени жизни липофусциновых гранул (τ_1 , τ_2 , τ_3) и FLIM изображения и гистограммы распределения амплитуд для каждой компоненты (A_1 , A_2 , A_3). Суспензия липофусциновых гранул помещалась в фокус конфокального сканирующего микроскопа. С помощью оптической схемы, возбуждающее излучение фокусировалось и, с помощью зеркал, производилось сканирование области со скоплением липофусциновых гранул. Фотоны люминесценции регистрировались, проходя оптическую схему, однофотонным детектором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Kennedy CJ, Rakoczy PE, Constable IJ. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye*. 1995;9:763–71.
- [2] Schmitz-Valckenberg S, Holz FG, Fitzke FW. Perspectives in imaging technologies. In: Holz FG, Schmitz-Valckenberg S, Spaide RF, Bird AC, editors. *Atlas of fundus autofluorescence imaging*. Berlin: Springer; 2007. p. 331–8.
- [3] Robert H. Hadfield, Göran Johansson / Superconducting Devices in [undefined]
Quantum Optics, Springer Cham 2016, p.249

Обнаружение радиационно-индуцированных изменений белого вещества головного мозга методом оптической когерентной томографии

К.А. Ачкасова^{1,2}, Л.С. Кухнина¹, А.А. Моисеев³, А.В. Полозова^{1,2}, Н.Д. Гладкова¹

¹ ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

² ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

³ ИПФ РАН, Нижний Новгород, Россия

Проведено исследование изменений морфологических и рассеивающих свойств белого вещества головного мозга крыс (на примере мозолистого тела) на различных временных этапах после облучения. Были обнаружены острая, ранняя отсроченная и поздняя фазы радиационно-индуцированных изменений, характеризующиеся статистически значимыми изменениями коэффициента затухания ОКТ сигнала в сравнении с нормой. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения метода ОКТ во время повторных резекций новообразований головного мозга после проведенной лучевой терапии.

Ключевые слова — белое вещество, оптическая когерентная томография, коэффициент затухания, лучевая терапия, головной мозг

I. ВВЕДЕНИЕ

Лучевая терапия является одним из компонентов лечения злокачественных новообразований головного мозга. Основной целью ее применения является уничтожение резидуальных опухолевых клеток, оставшихся в ложе опухоли после хирургического удаления опухолевой ткани. Для повышения эффективности лечения в зону облучения включают ткани вокруг ложа опухоли, что может приводить к развитию постлучевых изменений в нормальных тканях. Это в последующем обуславливает развитие трудностей при разграничении нормальных и патологически измененных тканей в ходе повторных хирургических вмешательств, что требует разработки новых интраоперационных диагностических методов.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на *ex vivo* образцах головного мозга крыс, разделенных на контрольную группу и группу, подвергшуюся воздействию ионизирующего излучения (однократно в дозе 15 Гр на область правого полушария головного мозга). На восьми временных точках после начала эксперимента (2–14 нед, 6 мес) проводилось выведение животных из эксперимента, с последующим ОКТ-исследованием и иммуногистохимическим исследованием фронтальных срезов головного мозга. Анализ ОКТ-данных выполнен путём вычисления коэффициента затухания и построения *en face*

цветокодированных оптических карт. В качестве области интереса было выбрано мозолистое тело.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате исследования нами были обнаружены острые (через 2 недели после облучения), ранние отсроченные (через 6 и 12 недель после облучения) и поздние (через 6 месяцев после облучения) радиационно-индуцированные изменения мозолистого тела. На этапе 2 недель после облучения умеренно выраженный отёк обнаруживался в области облучённого полушария. В дальнейшем, на этапе 6 и 12 недель отек обнаруживался также и в контралатеральном полушарии и характеризовался значительной выраженностью, что свидетельствует о распространении процесса по ходу миелиновых нервных волокон. Поздние изменения характеризовались тремя видами изменений: 1) возникновением отека; 2) нарушением целостности миелиновых волокон; 3) снижением количества олигодендроцитов.

При анализе ОКТ-данных выявлены соответствующие изменения в значениях коэффициента затухания. При этом на всех временных точках, характеризовавшихся возникновением отека мозолистого тела, нами были зарегистрированы статистически значимые снижения значений коэффициента затухания по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Поздние изменения сопровождалась более выраженным снижением коэффициента затухания, статистически значимо отличаясь как от нормального мозолистого тела, так и от мозолистого тела, характеризующегося изолированным отеком ($p < 0,05$).

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящего исследования были зарегистрированы три фазы радиационно-индуцированных изменений мозолистого тела, которые характеризовались снижением его рассеивающих свойств, что может быть обнаружено с помощью ОКТ.

Использование оптогенетического подхода для исследований в области клеточной физиологии

Д.Ф. Багаева¹, С.М. Бухалович¹, А.Д. Власова¹, А.А. Громова¹, А.П. Полякова¹, Н.А. Бондарев¹, Н.С. Ильинский¹, Ф.М. Цыбров¹, Горделий В.И.^{1,2}

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

² Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Université Grenoble Alpes–Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives–CNRS, Grenoble, France

Родопсины являются перспективными инструментами для оптогенетического манипулирования ионными градиентами в клетках и субклеточных компартментах, контроля pH цитозоля и внутриклеточных органелл. Ключевыми этапами разработки новых оптогенетических инструментов является их поиск и характеристика, а затем оценка их эффективности. Здесь мы описываем функциональные исследования родопсинов, перекачивающих протоны, и демонстрируем использование ксенородопсина *NsXeR* для закисления цитозоля и клеточных органелл.

Ключевые слова — оптогенетика, родопсины, протонные помпы, внутренние насосы

ВВЕДЕНИЕ

Оптогенетика – это метод, сочетающий оптику и генетику, для управления активностью возбудимых и невозбудимых клеток с помощью света. Вводя светочувствительные белки, называемые опсинами, в определенные клетки, предстает возможность с точностью активировать эти клетки, что позволяет манипулировать биологическими процессами с высоким пространственно-временным разрешением.

Основным инструментом оптогенетики являются микробные родопсины – светочувствительные белки, являющимися ионными каналами или насосами. Наша работа сосредоточена в двух основных направлениях оптогенетических технологий – разработка и характеристика новых оптогенетических инструментов – микробных родопсинов, а именно, поиск и структурная характеристика, а также направленная экспрессией в клеточные органеллы, исследование физиологических эффектов на клетках и оценка их эффективности. Ранее в 2017 была описана структура протонного насоса ксенородопсина *NsXeR* и показана его способность возбуждать нейроны [1]. Нами было показано, что ксенородопсин, перекачивающий протоны внутрь клетки под воздействием света, является мощным инструментом быстрого оптогенетического закисления цитозоля клеток млекопитающих. В частности, мы экспериментально

продемонстрировали оптогенетическое закисление цитозоля клеток человека за счет протонного насоса *NsXeR* на $0,6 \pm 0,2$ единицы pH и защелачивание цитозоля с помощью протонной помпы Arch3 на $0,3 \pm 0,1$ единицы pH при физиологических значениях pH [2].

Кроме того, наши исследования сосредотачиваются на новом развивающемся направлении – оптогенетике клеточных органелл, которая открывает принципиально новые возможности для неинвазивного контроля внутриклеточного метаболизма на уровне клеточных органелл с помощью света [3]. Нами впервые было показано защелачивание лизосом с помощью направленного экспрессированного родопсина *NsXeR*. Такой подход предполагается использовать для ингибирования работы лизосом с противоопухолевыми эффектами в перспективе.

Исследование внутренних протонных насосов, таких как ксенородопсины, расширяет функциональный репертуар родопсинов за пределы традиционных внешних насосов и ионных каналов.

Разработанные авторами оптогенетические подходы предлагают уникальные возможности для изучения клеточного метаболизма в норме и при патологии и помогут понять роль нарушения регуляции pH в клеточных дисфункциях, клеточной гибели и при возникновении онкологических заболеваний.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РФФ, грант № 21-64-00018.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Shevchenko V. et al. Inward H⁺ pump xenorhodopsin: Mechanism and alternative optogenetic approach // *Science advances*, 2017, V. 3(9), P. e1603187.
- [2] Vlasova A. et al. Optogenetic cytosol acidification of mammalian cells using an inward proton-pumping rhodopsin // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023. V. 242(3). P. 124949.
- [3] Vlasova A. D. et al. Intracellular microbial rhodopsin-based optogenetics to control metabolism and cell signaling // *Chemical Society Reviews*. 2024. V. 53(7). P. 3327-3349.

Особенности флуоресцентного профиля кофактора НАД(Ф)Н в слизистой оболочке кишечника на границе резекции у пациентов с колоректальным раком

М.В. Багрянцев¹, Е.Б. Киселева², М.Г. Рябков², А.А. Редькин², В.И. Щеславский²

¹ГБУЗ НО «НОКБ им. Н.А. Семашко», Нижний Новгород, Россия

²ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

Аннотация — у пациентов с колоректальным раком (КРР) стенка кишки, расположенная вне злокачественного процесса, при гистологических признаках интактности характеризуется изменением эндогенной флуоресценции в канале восстановленной формы никотин амида динуклеотида (НАД(Ф)Н). С помощью метода флуоресцентного макроимиджинга с временным разрешением (macro-FLIM) выявлено, что отдаленное метастазирование КРР (IV стадия) характеризуются сравнительно высокой интенсивностью энергетического обмена в слизистой оболочке толстой кишки, окружающей опухоль. В тонкой кишке с возрастанием стадии онкологического процесса при появлении регионарного метастазирования (III стадия) увеличивается роль гликолиза в энергетическом метаболизме энтероцитов. Выявленные нарушения являются важным патогенетическим звеном пострезекционных функциональных осложнений (ПФО), а полученные данные необходимы для коррекции алгоритмов послеоперационной терапии, энтерального питания у пациентов с КРР.

Ключевые слова — флуоресцентный время-разрешённый макроимиджинг (macro-FLIM); колоректальный рак; кишечник

I. ВВЕДЕНИЕ

Хирургический метод остаётся основным при лечении пациентов с КРР [1], однако он изменяет не только анатомию кишечника, но и его функционирование, что проявляется такими ПФО, как запоры, недержание кала или диарея [2]. При этом остаётся неясным, какую роль в появлении ПФО играют изменения слизистой оболочки кишечника, развивающиеся еще до операции по поводу КРР [3].

Цель исследования — изучить изменение флуоресцентного профиля слизистой оболочки условно нормального кишечника у пациентов с КРР, используя метод макро-FLIM.

II. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

В исследование включены 125 пациентов с неосложненным КРР. Образцы слизистой оболочки тонкой (66) и толстой (59) кишок размером 1,5×2,0 см получали в ходе оперативного вмешательства из зоны проксимальной

границы резекции и подвергали исследованию *ex vivo* с применением оригинального двухканального конфокального FLIM/PLIM макросканера (Becker&Hickl, Германия) с однофотонным возбуждением флуоресценции с помощью пикосекундных лазеров на длине волны 375 нм (детекция в диапазоне 435–485 нм). Мощность возбуждающего излучения составляла 12 мВт, время сбора фотонов — 90 с.

Результаты

По данным FLIM образцов тонкой кишки выявлены статистически значимые отличия в показателях среднего времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н (τ_m) между II и III ($p=0,031$), I и III ($p=0,018$) стадиями КРР. При I стадии КРР τ_m составило 1,61 [1,30; 2,02] нс, при II стадии — 1,50 [1,36; 1,73] нс, при III стадии — 1,37 [1,22; 1,51] нс. Изучение образцов толстой кишки показало, что статистически значимые различия ($p=0,027$) выявлены между IV и II стадиями КРР: значения составили 1,6 [1,4; 1,8] нс и 1,3 [1,1; 1,4] нс, соответственно.

III. ВЫВОДЫ

Уменьшение средневзвешенного времени жизни кофактора НАД(Ф)Н при возрастании стадии онкологического процесса косвенно свидетельствует о метаболических изменениях в ткани слизистой оболочки тонкой кишки в сторону увеличения роли гликолиза. В ткани слизистой оболочки толстой кишки при IV стадии КРР наблюдается высокая интенсивность энергетического обмена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Клинические рекомендации по лечению рака прямой кишки, рака ободочной кишки (2022). <https://cr.minzdrav.gov.ru> (дата обращения: 03.06.2024)
- [2] Pallan A, Dedelaite M, Mirajkar N, Newman PA, Plowright J, Ashraf S. Postoperative complications of colorectal cancer. Clin Radiol. 2021;76(12):896–907. DOI: 10.1016/j.crad.2021.06.002.
- [3] Larsen HM, Borre M, Christensen P, Mohr Drewes A, Laurberg S, Krogh K, Fassov J. Clinical evaluation and treatment of chronic bowel symptoms following cancer in the colon and pelvic organs. Acta Oncol. 2019;58(5):776–781. DOI: 10.1080/0284186X.2018.1562211.

Работа проведена при поддержке гранта РНФ №19-75-10096-п

Двойной внутриклеточный FLIM/PLIM сенсор на pH и уровень кислорода

В.А. Байгильдин, Ю.Р. Шакирова, С.П. Туник

Институт химии, Санкт-Петербургский Государственный Университет, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Ключевые слова — биоимиджинг, биосовместимые полимеры, сенсоры, флуорофоры, комплексы переходных металлов.

I. ВВЕДЕНИЕ

Оптический биоимиджинг, основанный на люминесцентных зондах, широко применяется в качестве высокочувствительного неинвазивного метода на различных уровнях: от маркировки и отслеживания отдельных биомолекул и клеточных компартментов до визуализации метаболических процессов в живых организмах. При этом ключевыми физиологическими параметрами, влияющими на протекание множества биологических процессов, является уровень оксигенации (концентрация кислорода) и pH среды.

В литературе продемонстрировано большое количество подходов, как к определению концентрации кислорода, так и к значению pH различных клеточных областей [1,2]. Однако, как правило, каждый из этих параметров определяется независимо друг от друга, что не дает полного понимания физиологического статуса биологического объекта или процесса.

Для одновременного картирования/мониторинга обоих физиологических параметров наиболее перспективными выглядят времяразрешённые методики оптического сенсинга, основанные на одновременном измерении времени жизни люминесцентных сенсоров на кислород и pH, которые базируются на совместном применении фосфоресцентных и флуоресцентных эмиттеров, дающих отклик на вариации концентрации кислорода и pH, соответственно.

С химической точки зрения сложность описываемого подхода состоит в создании универсальной биосовместимой платформы (носителя), позволяющей совместить фосфоресцентный и флуоресцентный эмиттеры, обладающие оптимальным набором фотофизических свойств (одновременное возбуждение обоих сенсорных люминофоров, отсутствие значительного перекрывания их эмиссии, сильный отклик времен жизни возбужденного состояния на вариации определяемых физиологических параметров).

II. РАЗДЕЛ I

В докладе будет представлен подход к созданию двойного pH-O₂ сенсора на основе ковалентного конъюгата родамина 6G и циклометилированного

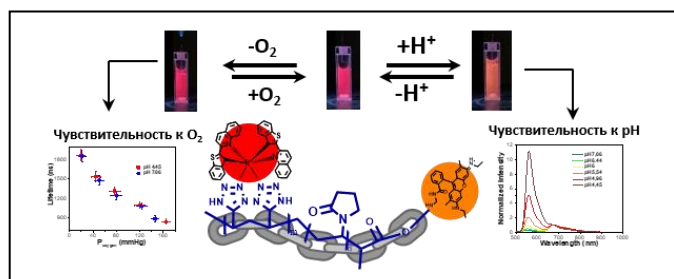


Рис. 1. Структура двойного сенсора.

комплекса иридия с сополимером на основе поли(винилпирролидон-блок-винилтетразол).

В модельных физиологических растворах сенсорные хромофоры продемонстрировали независимые фосфоресцентные и флуоресцентные отклики на изменение концентрации кислорода и pH, соответственно. Исследования на клетках CHO K1 показали преимущественную локализацию сенсора в эндосомах и лизосомах. При проведении FLIM-PLIM экспериментов подтвердилось, что фосфоресцентный хромофор предоставляет однозначную информацию о состоянии клеток в условиях гипоксии и нормоксии, а также полуколичественные данные о концентрации кислорода в клетках между этими двумя состояниями. Однако результаты FLIM-измерений показывали, что динамический интервал изменения времени жизни сенсора (около 0,5 нс между значениями pH 5,0 и 8,0) не позволяет адекватно интерпретировать значения pH в живых клетках. Тем не менее, вариации интенсивности эмиссии родамина значительно выше и позволяют грубо различать кислотные и нейтральные состояния клеток. Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что предложенный подход к конструированию двойных сенсоров pH-O₂ позволяет получить биосовместимый и водорастворимый конъюгат с независимым откликом эмиттером и быстрым клеточным поглощением.

БЛАГОДАРНОСТИ

Проект поддержан грантом РФФ № 23-73-01077.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Godet, I.; Doctorman, S.; Wu, F.; Gilkes, D.M. Detection of Hypoxia in Cancer Models: Significance, Challenges, and Advances. *Cells* 2022, 11, p. 686
- [2] Zagaynova, E. V.; Druzhkova, I.N.; Mishina, N.M.; Ignatova, N.I.; Dudenkova, V. V.; Shirmanova, M. V. Imaging of Intracellular PH in Tumor Spheroids Using Genetically Encoded Sensor SypHer2. 2017; pp. 105–119.

Интравитальная мультимодальная микроскопия ткани при окислительном стрессе

Д.С. Билан^{3,4,5}, Е.С. Потехина^{3,4,5}, А.Г. Шохина^{3,4,5}, В.В. Белоусов^{2,3,4,5}, А.А. Ланин^{1,2}

¹Физический факультет, МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

²ЛИФТ центр, Сколково, Москва, Россия

³Федеральный центр мозга и нейротехнологий (ФЦМН) ФМБА, Москва, Россия

⁴РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

⁵Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ИБХ) РАН, Москва, Россия

Методы нелинейно-оптической микроскопии открывают невероятные перспективы в исследованиях патологических процессов различной природы при их непосредственном развитии в тканях живого животного с субклеточным пространственным разрешением. В работе представлены результаты разработок техник спектроскопии двухфотонного возбуждения ряда новых белковых сенсоров активных форм кислорода и других молекул, а также их ратиометрической двухфотонной визуализации в клеточных культурах, переживающих срезах и живых животных.

Двухфотонная микроскопия, трехфотонная микроскопия, флуоресцентные сенсоры, микроскопия генерации гармоник

I. ВВЕДЕНИЕ

Поддерживаемые большим числом молекул окислительно-восстановительные реакции вносят важный вклад во внутри- и межклеточные сигнальные процессы, отражающиеся на транскрипции, пролиферации и регуляции метаболизма [1]. Значительное расширение возможностей мониторинга специфических регуляторов в режиме реального времени был обеспечен разработкой генетически кодируемых флуоресцентных белковых сенсоров [2]. Однако использование их в экспериментах по нелинейно-оптической визуализации в таких сложных биологических моделях как грызуны было затруднено за отсутствием количественных данных по яркости сенсоров, их динамического диапазона ответов и сложностью реализации двухфотонного ратиометрического опроса. Результаты нашей работы дают ответы на эти вызовы.

II. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как было показано в работе, аккуратное нелинейно-оптическое преобразование фемтосекундных импульсов в фотонно-кристаллическом световоде, предоставляет яркий источник высококогерентного широкополосного излучения (суперконтинуума) в диапазоне длин волн от 650 нм до 1100 нм, идеально подходящий для исследования нелинейно-оптических свойств сине-зеленых белковых сенсоров. Управление амплитудой и фазой излучения позволяет многократно повысить яркость, спектральное разрешение и эффективность спектроскопии. Такой источник использовался нами для количественных измерений

спектров двухфотонного возбуждения целой палитры окислительно-восстановительных и метаболических сенсоров состояния клетки [3], включая индикаторы перекиси водорода (HyPer), редокс статус НАД/НАДФ и глутатион (RexYFP и Grx1-roGFP2), гипогалогенные кислоты и уровень pH (Hypocrates и SypHer3s).

На основе полученных спектроскопических данных был разработан универсальный оптогенетический нелинейно-оптический инструмент для количественного мониторинга сенсоров в животных с высоким пространственным и временным разрешением на основе двухканальной двухфотонной микроскопии. Данный подход был использован для записи динамика пероксида водорода, pH и H₂O в клеточных культурах, переживающих срезах и живых животных [4, 5]. Безмаркерная многофотонная микроскопия генерации гармоник позволяет проследить изменения структуры ткани при развитии патологий и определить их фенотип *in situ* [6].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] S. Parvez, M. J. C. Long, J. R. Poganik, and Y. Aye, "Redox Signaling by Reactive Electrophiles and Oxidants," *Chem. Rev.* 118, 8798–8888 (2018)
- [2] A. I. Kostyuk, A. S. Panova, A. D. Kokova, D. A. Kotova, D. I. Maltsev, O. V. Podgorny, V. V. Belousov, and D. S. Bilan, "In vivo imaging with genetically encoded redox biosensors," *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8164 (2020).
- [3] A. S. Chebotarev, R. I. Raevsky, G. N. Linovsky, A. I. Kostyuk, V. V. Belousov, A. B. Fedotov, D. S. Bilan, and A. A. Lanin, "Ultrafast supercontinuum sculpting for two-photon spectroscopy and microscopy of ratiometric fluorescent indicators," *Applied Physics Letters*, 124(24), (2024).
- [4] A. S. Chebotarev, I. V. Kelmanson, A. D. Ivanova, Y. V. Khramova, V. A. Katrukha, D. A. Kotova, R. I. Raevskii, A. A. Moshchenko, G. N. Linovsky, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, D. S. Bilan, and A. A. Lanin, "Multiphoton tools for hydrogen peroxide imaging in vivo with subcellular resolution," *Sensors and Actuators B: Chemical* 410, 135646 (2024).
- [5] A. S. Chebotarev, M. S. Pochechuev, A. A. Lanin, I. V. Kelmanson, D. A. Kotova, E. S. Fetisova, A. S. Panova, D. S. Bilan, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Enhanced-contrast two-photon optogenetic pH sensing and pH-resolved brain imaging," *J. Biophotonics* 14, e202000301 (2021).
- [6] A. S. Chebotarev, V. S. Ledyeva, O. I. Patsap, A. A. Ivanov, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, A. G. Shokhina, and A. A. Lanin, "Multimodal label-free imaging of murine hepatocellular carcinoma with a subcellular resolution," *Journal of Biophotonics*, 16(12), p.e202300228 (2023).

Фотодинамическая инактивация грибов *Candida albicans*

М.С. Бирин¹, К.Ю. Гузенко¹, В.В. Елагин², Н.И. Игнатова²

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

²Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

Исследование посвящено определению эффективности фотодинамической инактивации (ФДИ) в отношении клинических изолятов *Candida albicans*. В отношении всех исследуемых штаммов был показан фунгицидный эффект ФДИ. Ввиду растущей резистентности кандид к антимикотикам, ФДИ может стать полноценной альтернативой для лечения кандидозов.

Фотодинамическая инактивация; кандидозы; Candida albicans; фотодитазин; фунгициды

I. ВВЕДЕНИЕ

Candida albicans является преимущественным этиологическим агентом в развитии оппортунистических микозов, поражающих дермальные и мукозальные ткани. Этот патоген особенно распространён среди женщин, находящихся в пременопаузе, состоянии беременности, а также у лиц, бессимптомно переносящих инфекцию, и при острых проявлениях вульвовагинального кандидоза (ВВК). Эпидемиологические данные показывают, что 70- 75% женщин испытывали хотя бы один эпизод ВВК в течение жизни. Резистентность *C. albicans* к антимикотическим средствам приводит к хронизации инфекционного процесса. Выявление кандидозов во время гестации связано с применением антимикробной терапии, увеличивающей вероятность тератогенных эффектов для плода. В свете этого, приоритетными задачами становятся разработка и внедрение альтернативных методик терапии указанных патогенов, одной из которых представляется фотодинамическая инактивация.

ФДИ - метод, основанный на образовании активных форм кислорода при активации фотосенсибилизатора (ФС) лазерным излучением с длиной волны, соответствующей пику поглощения.

II. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследование эффективности ФДИ в отношении клинических изолятов *C. albicans*.

III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на 6 штаммах *C. albicans* из коллекции кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины ПИМУ. Свежая суточная культура, выращенная на питательном бульоне (37°C), была разведена по МакФарланду 0,5 (1,5·10⁸ КОЕ/мл) в фосфатно-солевом буфере. ФДИ проводилась по

стандартной методике [2]. В качестве ФС использовался Фотодитазин (ФД, 50 мкМ, 15 минут). В работе использовался диодный лазер с длиной волны 650 нм и выходной мощностью 150 мВт, в течение 10 минут. После облучения суспензии пересевались на чашки Петри для последующего подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ). Подсчёт КОЕ производился в программе ImageJ.

IV. РЕЗУЛЬТАТЫ

В экспериментальных пробах, инкубированных в присутствии фосфатно-солевого буфера и фотодитазина, но не подвергнутых фотоактивации, наблюдалось уменьшение КОЕ в пределах стандартного отклонения. В образцах, подвергшихся фотоиндуцированной активации фотодинамического агента, зафиксировано полное отсутствие роста – фунгицидное воздействие

V. ВЫВОДЫ

В рамках научного исследования была продемонстрирована высокая эффективность фотодинамической инактивации (ФДИ) в отношении штаммов *Candida albicans*. Учитывая нарастающую резистентность *C. albicans* к традиционным антимикотическим препаратам и потенциальное отсутствие негативных побочных эффектов при использовании ФДИ [3], данный метод представляется перспективной альтернативой для лечения острых и хронических форм кандидозных инфекций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Farr A, Effendy I, Frey Tirri B, Hof H, Mayser P, Petricevic L, Ruhnke M, Schaller M, Schaefer APA, Sustr V, Willinger B, Mendling W. Guideline: Vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k). *Mycoses*. 2021 Jun;64(6):583-602. doi: 10.1111/myc.13248. Epub 2021 Feb 27. PMID: 33529414; PMCID: PMC8248160.
- [2] Игнатова Н.И., Елагин В.В., Будруев И.А., Антонян А.Э., Стрельцова О.С., Каменский В.А. Применение фотодинамической инактивации в отношении возбудителей инфекций мочевыводящих путей. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2022. Т24. №4.с.395-400. <https://doi.org/10.36488/cmac.2022.4.395-400>
- [3] Streltsova, O.; Antonyan, A.; Ignatova, N.; Yunusova, K.; Elagin, V.; Kamensky, V. Preclinical Studies on the Safety and Toxicity of Photoditazine in the Antibacterial Photodynamic Therapy of Uropathogenic Bacteria. *Biomedicine* 2023, 11, 2283. <https://doi.org/10.3390/biomedicine11082283>

Фосфоресцентные полимерные комплексы иридия(III) для биомедицинских исследований

Л.Н. Бочкарев¹, Ю.П. Паршина¹, А.Д. Комарова^{2,3}, П.О. Бабер¹, М.В. Ширманова², В.И. Щеславский²

¹ Институт металлоорганической химии им. Г. А. Разуваева Российской академии наук, Нижний Новгород, Россия

² Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

³ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

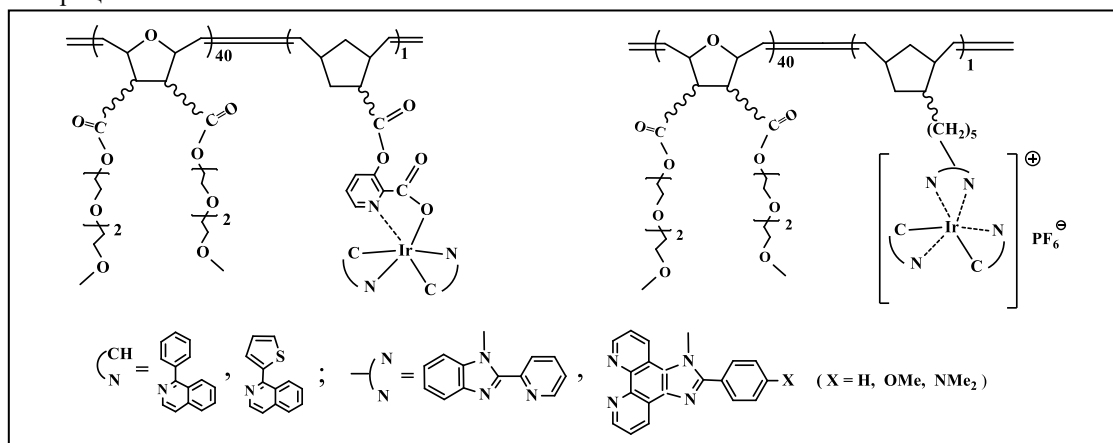
Аннотация — Синтезированы фосфоресцентные полимерные комплексы иридия(III). Определены фотофизические характеристики синтезированных соединений. Изучены цитотоксические свойства полимерных комплексов и установлена возможность их применения в качестве сенсоров кислорода в биологических объектах.

Ключевые слова — полимерные комплексы иридия(III); метатезисная полимеризация; фосфоресценция; цитотоксичность; опухолевые клетки; сенсоры кислорода

Среди иридийсодержащих оптических сенсоров кислорода в биологических объектах несомненный интерес представляют фосфоресцентные комплексы иридия(III), инкорпорированные в водорастворимую полимерную матрицу. В отличие от низкомолекулярных аналогов, полимерные иридийсодержащие сенсоры обладают повышенной проникающей способностью и более длительное время удерживаются в живых клетках и тканях.

В ходе наших исследований, направленных на разработку оптических иридийсодержащих сенсоров, методом метатезисной полимеризации синтезирована серия фосфоресцентных циклометаллированных комплексов иридия(III), химически связанных с водорастворимой полиоксанорборненовой полимерной матрицей.

фосфоресценции составляют 6.2-3.3 мкс. В аэрированных растворах квантовые выходы и времена жизни фосфоресценции уменьшаются в 1.9-1.5 раза. Установлено, что некоторые полимерные комплексы обладают высокой цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам, и могут рассматриваться как потенциальные противоопухолевые препараты. Другие полимерные иридиевые люминофоры являются нетоксичными, легко проникают в живые клетки и ткани, и могут быть использованы в качестве сенсоров кислорода в биологических объектах. Обнаружено, что цитотоксичность полимерных комплексов и их способность проникать в клетки и ткани зависит от природы циклометаллирующих и дополнительных лигандов в иридийсодержащих фрагментах, связанных с полимерной матрицей.



Изучение фотофизических свойств синтезированных полимерных комплексов иридия(III) показало, что они проявляют интенсивную кислород-зависимую фосфоресценцию оранжевого и красного цветов. Квантовые выходы комплексов в дегазированных водных растворах составляют 8.8-2.8%, а времена жизни

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, (проект № 23-15-00294).

SERS-зависимое изучение изменений конформации гема цитохрома С при модуляции активности дыхательной цепи митохондрий

Ж.В. Бочкова¹, Э.И. Никельшпарг¹, А.А. Байжуманов¹, В.Г. Гривенникова², А.А. Семёнова³, С.М. Новиков⁴, В.С. Волков⁴, А.В. Арсенин⁴, Д.И. Якубовски⁴, А.В. Евлюхин⁵, Е.А. Гудилин³, Г.В. Максимов¹, О. Сосновцева⁶, А.Б. Рубин¹, Н.А. Браже¹

¹Кафедра биофизики, биологический факультет МГУ им. В.Ломоносова, Москва, Россия

²Кафедра биохимии, биологический факультет МГУ им. В.Ломоносова, Москва, Россия

³Факультет наук о материалах МГУ им. В.Ломоносова, Москва, Россия

⁴Центр фотоники и 2D-материалов, Московский институт физики и технологий, Москва, Россия

⁵Институт квантовой оптики, Ганновский университет, Ганновер, Германия

⁶Кафедра биомедицинских наук, факультет здоровья и медицины Копенгагенского университета, Копенгаген, Дания

Мы разработали метод, основанный на спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР, SERS) с серебряными плазмонными наноструктурами для изучения конформационных изменений гема цитохрома С в функционирующих интактных митохондриях. Модулируя условия работы дыхательной цепи митохондрий, мы впервые показали зависимость конформации гема цитохрома С от активности дыхательной цепи, значения рН и потенциала на внутренней митохондриальной мембране. На основе данных сделан вывод, что изменения конформации гема цитохрома С являются способом регуляции активности электронного транспорта на участке комплекс III-цитохром С – комплекс IV. Впервые нами установлено, что при патологии – спонтанной гипертонии – нарушается регуляция конформации цитохрома С, а следовательно, ухудшается регуляция активности всей дыхательной цепи.

Ключевые слова — митохондрии; цитохром С; ЭТЦ; спектроскопия комбинационного рассеяния; ГКР

I. ВВЕДЕНИЕ

Цитохром С — подвижный переносчик электронов электрон-транспортной цепи митохондрий (ЭТЦ), содержащий гем С в качестве кофактора. Гем представляет преимущественно плоский порфириновый макроцикл, при этом для него были зарегистрированы неплоскостные деформации, образующие т.н. искаженную конформацию. Известно, что конформация гема коррелирует с физико-химическими свойствами фермента: переключаясь между плоской и искаженной конформациями, гем способен изменять редокс-потенциал фермента, ускоряя и замедлять электронный транспорт. Однако недостаточно изучена функциональная значимость конформационных изменений гема в регуляции работы дыхательной цепи митохондрий.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С помощью серебряных иерархических наноструктур, усиливающих сигнал комбинационного рассеяния от изолированных митохондрий, при длине волны возбуждения 532 нм были зарегистрированы SERS спектры, соответствующие спектрам окисленного примембранного цитохрома С. Активность ЭТЦ

модулировали, внося к митохондриям клеток сердца крыс линии WKY субстраты цикла Кребса, протонофор СССР и калиевый ионофор валиномицин. Митохондрии кардиомиоцитов крыс линии SHR служили моделью патологической работы ЭТЦ.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ

Было показано, что конформация гема цитохрома С чувствительна к увеличению потребности клетки в АТФ и связанным с этим изменениям макропараметров среды цитохрома С. Диссипация протонного градиента в межмембранном пространстве и деполяризация внутренней митохондриальной мембраны, как следствие разобщения окислительного фосфорилирования и электрон-транспортной функции ЭТЦ при ускорении поглощения O₂ митохондриями, коррелировали с повышением вероятности плоской конформации гема цитохрома С [1]. Более высокий электрохимический потенциал на мембране и низкий рН, напротив, коррелировали с более искаженной конформацией гема, что согласуется с необходимостью ЭТЦ замедлить электронный транспорт. При этом в патологических условиях работы ЭТЦ при гипертонии конформационная чувствительность гема к ускорению митохондриального дыхания не наблюдается, что может обуславливать несбалансированность энергетических потребностей и оптимального производства АТФ митохондриями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Brazhe, N.A.; Nikelshparg, E.I.; Baizhumanov, A.A.; et al., SERS uncovers the link between conformation of cytochrome c heme and mitochondrial membrane potential. *Free Radic. Biol. Med.* 2023, 196, 133–144

Изучение редокс-состояния митохондрий астроцитов и нейронов мозга *in vivo* при помощи микроспектроскопии комбинационного рассеяния

Н.А.Браже^{1,2}, К.И. Морозова¹, А.Б. Тяглик^{1,2}, А.А. Федотова^{1,2}, А.Р. Браже^{1,2}, М.С. Шестопалова², Ю.В. Храмова^{1,2}, А.В. Залыгин², А.А. Быков³, А.Ю. Белых³, А.А. Корнеева³, Г.Н. Мартынов⁴, В.А. Олейников², Д.С. Билан², А.В. Семьянов²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

²Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

³Научно-технологический центр уникального приборостроения РАН, Москва, Россия

⁴Физический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

Впервые мы разработали подход, основанный на микроспектроскопии комбинационного рассеяния (КР) в сочетании с флуоресцентными белками или генетически кодируемым биосенсором для исследования редокс-состояния дыхательной цепи (электронтранспортной, ЭТЦ) митохондрий идентифицированных нейронов и астроцитов в коре мозга бодрствующих мышей. Также мы показали, что микроспектроскопия может быть успешно использована для мониторинга локальной оксигенации крови в артериолах и венах коры мозга мышей *in vivo*.

Ключевые слова — митохондрии, дыхательная цепь, цитохромы, перекись водорода, оксигенация крови, спектроскопия комбинационного рассеяния, *NuPer 7*

I. ВВЕДЕНИЕ

Редокс-состояние клеток тесно связано с активностью дыхательной цепи митохондрий. Активность ЭТЦ должна точно соответствовать текущим потребностям клеток в АТФ, при этом, регуляция работы ЭТЦ необходима для оптимизации количества супероксид-анион радикала (O_2^-), образующегося в комплексах I и III. В клетках мозга и, в особенности в астроцитах, генерация O_2^- с последующим образованием других активных форм кислорода (АФК) может использоваться в сигнальных процессах или приводить к развитию окислительного стресса. Для понимания процессов регуляции активности ЭТЦ и их взаимосвязи с образованием АФК необходимы подходы, позволяющие *in vivo* оценить локальную оксигенацию крови в редокс-состояние ЭТЦ митохондрий и детектировать генерацию АФК.

II. МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на мышах линии C57Bl/6 в возрасте 4-6 мес. Предварительно проводили операцию по установке хронического краниального окна с инъекцией в область соматосенсорной коры вирусов, кодирующих флуоресцентные белки GFP или NiRFP (AAV-*php.B-gfaABC1D-PI-Lck-GFP-SV40polyA* и AAV-*php.B-hSyn-*

NirFP-WPRE-hGHpolyA) или вирусы, кодирующие биосенсор на перекись водорода (H_2O_2) (AAV9-GFAP-*m7NuPer7-WPRE-SV40* и AAV9-*hSyn-m7-NuPer7-WPRE*) под астроцитарным или нейрональным промоторами. Редокс-состояние ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов, а также локальную степень оксигенации крови сосудов соматосенсорной коры мышей оценивали по спектрам КР, зарегистрированным с использованием КР-микроспектрметра InVia Qontor (Renishaw, UK) с прямым микроскопом FSM Leica, лазерным возбуждением 532 нм. Образование H_2O_2 в митохондриях нейронов и астроцитов коры бодрствующих мышей исследовали, регистрируя спектры флуоресценции *NuPer7* при лазерном возбуждении 473 нм. Во всех экспериментах мышь располагали на специальной беговой дорожке и регистрировали спектры КР и флуоресценции *NuPer 7* в состоянии покоя животного и при вызванном беге.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы разработали подход, позволяющий по спектрам КР астроцитов и нейронов определять относительное содержание восстановленных цитохромов *B* и *C*-типов в ЭТЦ митохондрий и оценивать степень заполненности ЭТЦ электронами. По спектрам КР сосудов проводили количественный мониторинг степени оксигенации крови в сосудах. Было установлено, что при физической активности мышей ЭТЦ митохондрий астроцитов заполняется электронами, что сопровождается генерацией H_2O_2 . В нейронах, напротив, снижалось относительное содержание восстановленных переносчиков электронов и не изменялась продукция H_2O_2 . При этом наблюдалось расширение сосудов и увеличение локальной оксигенации крови. Предполагается, что H_2O_2 , образующаяся в астроцитах, необходима для сигнальных процессов между астроцитами и другими компонентами мозга. Предложенный подход может быть успешно использован для исследования редокс-процессов, протекающих в мозге при различных патологиях.

Работа выполнена при поддержке РФФ 23-44-00015.

Исследование внутриклеточного транспорта TERT методом флуоресцентной микроскопии

Д.С. Буркатовский¹, А.О. Богородский¹, В.И. Борщевский¹
¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

Методы флуоресцентной микроскопии часто используются для исследования транспорта белков в митохондрии. Было установлено, что флуоресцентные белки типа бета-бочонка не подходят для этих целей из-за их неспособности пересекать митохондриальные мембраны. В качестве альтернативы была применена метка SNAP-tag, способная пересекать митохондриальные мембраны в зрелом виде. С помощью SNAP-tag была изучена релокация белковой субъединицы теломеразы TERT в митохондрии при окислительном стрессе. Результаты показали, что TERT не перемещается из ядра в митохондрии в зрелом виде, что указывает на иной механизм регуляции уровня TERT в митохондриях.

Митохондрии, транспорт белков, SNAP-tag, TERT, флуоресцентная микроскопия

I. ВВЕДЕНИЕ

Перемещение белков между компартментами клетки часто исследуется с помощью методов флуоресцентной микроскопии. Для этого исследуемый белок необходимо пометить флуоресцентной меткой. Чаще всего в качестве такой метки используют флуоресцентные белки, экспрессируемые в виде химеры с целевым белком. Однако данный подход имеет определенные трудности при изучении транспорта белков в митохондрии. Флуоресцентные белки, имеющие структуру бета-бочонка, слишком велики и стабильны, чтобы транспортироваться митохондриальной транспортной машинерией через TIM/TOM комплексы [1].

Мы нашли флуоресцентную метку, более подходящую для изучения транспорта таких белков. SNAP-tag – самометающийся белок, способный в зрелом виде пересекать мембрану митохондрий. С помощью этой метки мы исследовали релокацию белковой субъединицы теломеразы TERT в митохондрии. Известно, что при воздействии окислительного стресса на клетку возрастает уровень TERT в митохондриях [2], [3]. Чтобы понять, транспортируется ли туда TERT в зрелом виде, или имеет место его синтез *de novo*, был проведен эксперимент с использованием химерного белка TERT-SNAP.

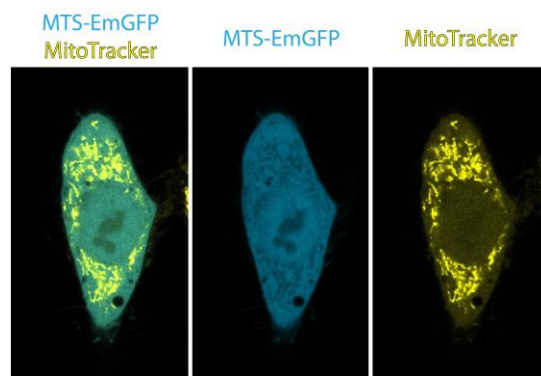


Рис. 1. Инжектированный в клетку MTS-EmGFP через 1 час инкубации. Клетка окрашена MitoTracker Deep Red. Сигналы EmGFP и MitoTracker обозначены псевдоцветами для улучшения восприятия.

II. РЕЗУЛЬТАТЫ

A. Подбор метки

Наши исследования показали, что зрелый белок EmGFP не может быть транспортирован клеткой внутрь митохондрий. Для этого EmGFP с митохондриальной целевой последовательностью (MTS) был экспрессирован в *E. coli* и доставлен в клетки методом микроинъекции. Показано, что в этом случае EmGFP не заходит в матрикс, предположительно застревая в транспортном TOM комплексе на внешней мембране. В то время как SNAP-tag с MTS в аналогичном эксперименте успешно импортируется в митохондрии. Это показывает пригодность использования SNAP-tag в качестве метки для отслеживания транспорта зрелых белков.

B. Отслеживание транспорта TERT

Используя химерный белок TERT-SNAP, мы показали, что TERT при воздействии окислительного стресса на клетку не транспортируется в зрелом виде из ядра в митохондрии. Что приводит нас к выводу об ином механизме повышения уровня TERT в них – предположительно путем регуляции на уровне экспрессии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] A. Bogorodskiy *et al.*, "Accessing Mitochondrial Protein Import in Living Cells by Protein Microinjection," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, no. July, 2021.
- [2] J. Haendeler *et al.*, "Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, no. 6, pp. 929–935, Jun. 2009.
- [3] C. Singhapol, D. Pal, R. Czapiewski, M. Porika, G. Nelson, and G. C. Saretzki, "Mitochondrial Telomerase Protects Cancer Cells from Nuclear DNA Damage and Apoptosis," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, 2013.

Диагностика эффективности доставки лекарств в раковые клетки методом гигантского комбинационного рассеяния

М.И. Васильева¹, Д.А. Назаровская¹, Н.В. Первушин¹, Ж.В. Самсонова¹, Л.А. Осминкина¹
¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, МГУ, Москва, Россия

Аннотация – Явление гигантского комбинационного рассеяния света улучшает качество диагностики с помощью рамановской спектроскопии адресной доставки лекарства в раковые клетки и биодegradацию наноконтейнеров из пористого кремния.

Ключевые слова: пористые кремниевые наночастицы; гигантское комбинационное рассеяние света; биодegradация

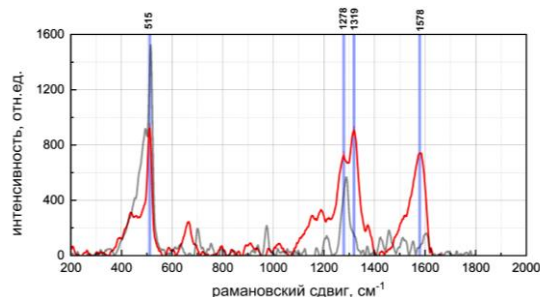
I. ВВЕДЕНИЕ

Метод спектроскопии комбинационного рассеяния света (КР) применяется в биомедицине для изучения и диагностики клеток, их метаболитов, лекарственных препаратов и т.п. КР заключается в бесконтактном воздействии электромагнитной волной на исследуемый образец. Каждый химический элемент характеризуется набором частот, присущих только ему, поэтому по частотному спектру рассеянного света можно однозначно определить вещество. [1] Однако само по себе КР слабое, и интенсивности оптического сигнала недостаточно для его однозначной интерпретации.

Повысить чувствительность позволяет явление гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) - это усиление сигнала КР от молекул, адсорбированных на нанощероховатой поверхности благородных металлов, на которой возникает возбуждение локализованных плазмонов (явление локализованного поверхностного плазмонного резонанса - ЛППР). [2]

Наночастицы на основе пористого кремния (пКНЧ) являются перспективным материалом в наномедицине и могут быть использованы как наноконтейнеры для адресной доставки лекарств, т.к. растворяются до нетоксичной кремниевой кислоты в живом организме. В [3] методом КР продемонстрирована кинетика релиза лекарства и биодegradация пКНЧ, загруженных Доксорубицином, в раковых клетках. Однако ожидается усиление сигнала КР от загруженного в поры лекарства благодаря модификации поверхности пКНЧ наночастицами золота.

Рис. 1. Спектр КР кремниевых частиц, загруженных Сунитинибом. Красная линия – композит кремний + золото, серая линия – наночастицы



кремния. Пик 515 см⁻¹ соответствует пКНЧ, остальные соответствуют Сунитинибу. На пике 1578 см⁻¹ хорошо видно усиление сигнала КР благодаря явлению ГКР.

II. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы разработана методика изготовления нового композитного материала кремний/золота Au-пКНЧ. Изучены физико-химические свойства полученных наночастиц: их диаметр составил около 100 нм, зета-потенциал -14 мВ. Отработана методика загрузки лекарства (Сунитиниб) в поры Au-пКНЧ. Исследована их цитотоксичность при инкубации с клетками НСТ в течении 24 ч, 50% токсичная доза составила 200 мкг/мл. Получено усиление сигнала КР от Сунитиниба. (см. Рис.1) Изучена биодegradация наночастиц в клетках.

Полученные результаты показывают перспективу и безопасность применения в качестве наноконтейнеров композитных наночастиц Au-пКНЧ для адресной доставки и контроля выхода лекарства в раковых клетках методом КР.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-15-00137, <https://rscf.ru/project/24-15-00137/>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Новикова В.А., Варжель С.В., Рассеяние света и его применение в волоконной оптике, Университет ИТМО, 2019, сс.13-18, 28-30.
- [2] J.-H. Park, et al. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications, Nature Materials, 2009, vol. 8, pp. 331-336.
- [3] P.V. Maximchik, et al, Biodegradable Porous Silicon Nancontainers as an Effective Drug Carrier for Regulation of the Tumor Cell Death Pathways, ACS Biomater Sci Eng, 2019, vol. 5(11), pp. 6063-6071.

Лазерная освещенность в оптоакустической микроскопии оптического разрешения

Д.А. Войтович¹, А.А. Курников¹, А.Г. Орлова¹, Л.Е. Шимолина², А.Д. Комарова², М.В. Ширманова², П.В. Субочев¹

¹Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-Грехова РАН, Нижний Новгород, Россия

²Институт экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ПИМУ, Нижний Новгород, Россия

Оптоакустическая микроскопия с оптическим разрешением (ОР-ОАМ) представляет собой метод визуализации *in vivo*, предлагающий микронное пространственное разрешение с высоким контрастом. В работе изучен вопрос лазерной безопасности в ОР-ОАМ и построена модель, позволяющая рассчитать лазерную освещенность на образце из характеристик ультразвукового детектора. Представлены результаты апробации модели в *in vivo* эксперименте.

Ключевые слова — оптоакустическая микроскопия; оптическое разрешение; порог лазерной безопасности; шумовой эквивалент освещенности; шумовой эквивалент давления; эксперимент *in vivo*

I. ВВЕДЕНИЕ

ОА-микроскопия основана на поглощении импульсного оптического излучения различными хромофорами в биологических тканях. В результате поглощения акустические волны, генерируемые в тканях, несут информацию о структуре и функциональном состоянии поглотителей. В данной работе рассматривается вопрос лазерной безопасности применительно к схеме ОА-микроскопии с оптическим разрешением, когда используется сфокусированное лазерное излучение. Чтобы ОР-ОАМ была неинвазивной, необходимо контролировать уровень максимальной освещенности образца, создаваемого каждым лазерным импульсом, который не должен превышать 20 мДж/см². Для планирования безопасного *in vivo* эксперимента и оценки освещенности в работе построена феноменологическая модель расчета освещенности из характеристик детектора: шумового эквивалента давления и геометрии антенны. Представлены результаты апробации модели в *in vivo* эксперименте с использованием оптоакустического микроскопа на основе градиентной линзы и кополимерной ультразвуковой антенны.

II. МЕТОДЫ

Был введен шумовой эквивалент лазерной освещенности (NELI) как минимальное лазерное излучение, необходимое для генерации и обнаружения оптоакустического сигнала с помощью ультразвукового детектора, характеризуемого шумовым эквивалентом давления (NEP) в виде следующей феноменологической модели:

$$NELI = \frac{NEP k}{\mu_a \Gamma \gamma}$$

где μ_a - коэффициент оптического, Γ - параметр Грюнайзена крови, k - коэффициент распространения, γ - коэффициент частотно-зависимого затухания УЗ сигнала.

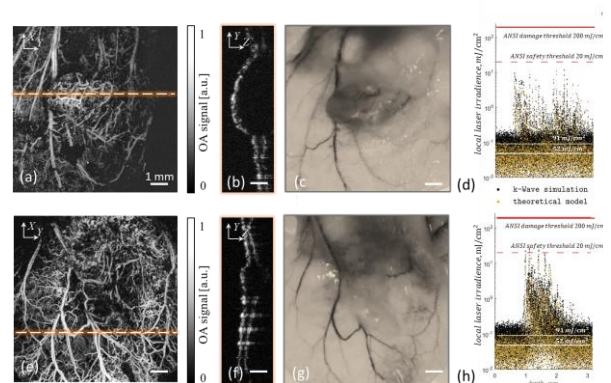


Рис. 1. ОАМ-визуализация сосудистой системы опухолей HeLa без лечения (а-с) и после ФДТ (е-г). (а, е) - проекция максимальной интенсивности по глубине; (б, ф) — выбранные В-сканы; (с, г) — фотографии опухолей; (д, h) — оценки локальной лазерной освещенности.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ

В *in vivo* эксперименте было произведено сканирование опухоли на ухе мыши (рис 1 а-с, е-г). Была рассчитана локальная лазерная освещенность из экспериментальных значений отношения сигнала к шуму (рис. 1 д, h). Полученные значения лежат ниже порогов безопасности и разрушения 200 мДж/см². Это достигается в текущей схеме за счет заглупления фокусной перетяжки лазера в образце на 150 мкм, где становится существенным рассеяние, а также за счет использования неострой фокусировки. Таким образом, предлагаемая модель оценки освещенности продемонстрировала безопасность проведения *in vivo* эксперимента при данной конфигурации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим Российский научный фонд (19-75-10055). Мы благодарим профессора Д. Рязанского (ETH Цюрих, Швейцария) за предоставление градиентных линз.

Оптические методы для планирования и мониторинга ФДТ

С.В. Гамаюнов¹

¹ГУАЗ НИИКО НОКОД, Нижний Новгород, Россия

Аннотация — основным ограничением широкого использования ФДТ является отсутствие стандартизированных подходов к дозиметрии, планированию и мониторингу эффективности лечения. Работа посвящена изучению возможностей оптических методов для решения данных задач.

Ключевые слова — ФДТ; ОКТ; FLIM; флуоресцентная диагностика

I. ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на прогрессирующее развитие ФДТ актуальным вопросом остается оптимизация технологии по нескольким направлениям: стандартизация лечебно-диагностических протоколов, разработка и внедрение методов выявления предикторов ответа на ФДТ и раннего контроля эффективности лечения, создание количественных инструментов для планирования, дозиметрии и мониторинга протекания фотодинамической реакции [1].

II. РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение параметров флуоресценции показало, что подгруппа пациентов с сочетанием показателей высокой флуоресцентной контрастности ($ФКв > 1,2$) и полного фотовыгорания ($ФВп > 25\%$), ($n=142$) характеризуется наиболее благоприятным прогнозом: 93,7% полных ответов и 97% пациентов наблюдаются без рецидива в сроки от 1,5 до 6,8 лет, и медиане наблюдения 3,9 года.

Изменения, выявленные при ОКТ-ангиографии тканей опухоли в ранние сроки после проведения процедуры (в первые 24 часа), коррелируют с показателями онкологической эффективности ФДТ. При пороговом значении сосудистой плотности опухоли через сутки после процедуры 1,4% диагностическая точность предсказания неполного ответа или рецидива в течение 12 месяцев составляет 93% ($AUC=0,97$).

Изменения сосудистой структуры перитуморальной зоны представляют интерес с точки зрения влияния на репарацию и косметические результаты. При пороговом значении сосудистой плотности в перитуморальной зоне через 24 часа после ФДТ 1,4% диагностическая точность предсказания формирования гипертрофического рубца составляет 88% ($AUC=0,88$).

Сочетание свойств фотосенсибилизатора и флуоресцентного молекулярного ротатора для Pz I позволяет при проведении ФД и ФДТ контролировать функциональное состояние малигнизированных клеток в ходе диагностического исследования, а также при проведении лечения по изменению времени жизни возбужденного состояния флуорофора. Это расширяет возможности флуоресцентного биоимиджинга и дает возможность проводить процедуру фотодинамической терапии с изучением изменений на субклеточном уровне в режиме реального времени и ранней оценкой эффективности проведенного воздействия.



© изм. из В. С. Wilson, M. S. Patterson, and L. Ulge Lasers Med. Sci., 1997.

Рис. 1. Ключевые этапы для планирования и мониторинга ФДТ.

БЛАГОДАРНОСТИ

1 договор № 14.В25.31.0015 «Разработка новых технологий оптической когерентной томографии для задач индивидуальной терапии рака»,

2 проект RFMEFI60414X0027 «Разработка и создание устройства флуоресцентной визуализации для контроля накопления фотосенсибилизатора и мониторинга процесса фотодинамической терапии».

3 РФФИ «Порфиразиновые свободные основания, как новые агенты для тераностики: фотодинамической терапии и флуоресцентного имиджинга», проект № 14-02-00753/14

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] De Silva, P. Photodynamic therapy, priming and optical imaging: Potential co-conspirators in treatment design and optimization — a Thomas Dougherty Award for Excellence in PDT paper / P. De Silva, M.A. Saad, H.C. Thomsen [et al.] // Porphyrins Phthalocyanines. – 2020. – N. 24. – P. 1321–136

Поляризационная время-разрешенная лазерная спектроскопия флуоресцентных эндогенных молекулярных зондов

И.А. Горбунова, Д.А. Волков, Д.В. Яшков, М.Э. Сасин, О.С. Васютинский
ФТИ им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация — В докладе представлен обзор результатов экспериментальных и теоретических исследований динамики поляризационно-зависимых фотоиндуцированных процессов, происходящих в возбужденных состояниях коферментов NADH, NADP и FAD при облучении фемтосекундными лазерными импульсами, проведенных в лаборатории оптики биомолекул и кластеров ФТИ им. А.Ф. Иоффе.

Ключевые слова — NAD(P)H, FAD, анизотропия, TCSPC, возбуждение-зондирование

На сегодняшний день одним из приоритетных направлений биомедицины и биотехнологий является разработка неинвазивных лазерных методов диагностики живых клеток и тканей [1]. Одним из таких перспективных методов является мониторинг время-разрешенной флуоресценции эндогенных флуорофоров, к числу которых относятся коферменты NADH, NADPH и FAD. Однако взаимосвязь между фундаментальными фотофизическими свойствами этих коферментов и биохимическими процессами все еще далека от понимания. Таким образом возникает потребность в проведении детальных исследований поляризационно-зависимых фотофизических свойств коферментов NADH, NADPH и FAD в свободной форме и при связывании с ферментами в растворах.

В рамках работы для исследования динамики возбужденных состояний молекул NADH, NADPH и FAD был использован метод многофотонной поляризационной флуоресцентной спектроскопии [2, 3]. В рамках метода осуществлялось одновременное наблюдение затухания ортогональных поляризационных компонент флуоресценции в режиме счета фотонов (TCSPC).

В результате применения метода флуоресцентной спектроскопии впервые были получены следующие основные результаты. Было показано, что наличие двух времен затухания флуоресценции свободного NADH обусловлено различием вероятностей безызлучательных переходов для *cis* и *trans* конформаций никотинамида [2]. В свою очередь существование только одного времени затухания флуоресценции для связанного с ферментом NADH обусловлено тем, что кофермент находится в сайте связывания в единственной *trans* конформации. Обнаружен новый механизм деполяризации

флуоресценции в связанном состоянии NADH и NADPH, который обусловлен поворотом дипольного момента перехода флуоресценции за счет перестройки конфигурации ядер в процессе колебательной релаксации [3]. Обнаруженный эффект позволил существенно изменить интерпретацию результатов многих экспериментов, наблюдавшихся при исследовании живых клеток методом FLIM в других лабораториях. Было проведено исследование квантового выхода флуоресценции NADH и FAD в водно-спиртовых растворах [4]. Одновременный анализ зависимости времен затухания флуоресценции и квантового выхода флуоресценции от концентрации спирта в растворе позволил разделить несколько различных процессов релаксации в возбужденном состоянии коферментов и выделить факторы, влияющие на скорость этих процессов. Полученные результаты могут быть использованы для развития методов диагностики социально-значимых заболеваний на ранних стадиях и разработки методов тестирования лекарственных препаратов на клеточном уровне.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность РФФИ за финансовую поддержку в рамках гранта 23-22-00230

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [2] R. Cao, H. K. Wallrabe, and A. Periasamy, "Multiphoton flim imaging of NAD(P)H and FAD with one excitation wavelength," J. Biomed. Opt., vol. 25, pp. 1-16, 2020.
- [3] I.A. Gorbunova, M.E. Sasin, D. P. Golyshev, A.A. Semenov, A.G. Smolin, Y.M. Beltukov, O.S. Vasyutinskii, "Two-Photon Excited Fluorescence Dynamics in Enzyme-Bound NADH: the Heterogeneity of Fluorescence Decay Times and Anisotropic Relaxation", J. Phys. Chem. B, 125(34), 9692-9707, 2021.
- [4] I. A. Gorbunova, M. E. Sasin, J. Rubayo-Soneira, A. G. Smolin, O. S. Vasyutinskii, "Two-Photon Excited Fluorescence Dynamics in NADH in water-methanol solutions: the Role of Conformation States", J. Phys. Chem. B, 124 (47), 10682-10697, 2020.
- [5] I.A. Gorbunova; M.K. Danilova; M.E. Sasin; V.P. Belik; D.P. Golyshev; O.S. Vasyutinskii, Determination of fluorescence quantum yields and decay times of NADH and FAD in water-alcohol mixtures: The analysis of radiative and nonradiative relaxation pathways, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, V 436 (1), 2023

Мультимодальные контрастные агенты: технология получения, свойства, биомедицинские применения

Д.А. Горин¹

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Аннотация – Визуализация границы нормальная/патологическая ткань, также как ангиография являются приоритетными задачами современной биофотоники. Решения таких задач связано с применением мультимодальных контрастных агентов. Мультимодальность означает способность обеспечивать контраст при использовании различных методов, которые используются в клинической практике, например МРТ, ультразвуковая, оптоакустическая и флуоресцентная визуализация. Рассмотрены различные типы контрастных агентов и методы их получения. Показана возможность мультимодальной визуализации *in vitro* и *in vivo*.

Современные наноструктурированные частицы, применимые в медицине, представляют собой мультифункциональные системы, к которым предъявляется целый ряд требований: 1) способность переносить инкапсулированное биоактивное вещество в необходимой терапевтической дозе; 2) преодоление барьеров, например гематоэнцефалического; 3) обеспечение адресной доставки; 4) реализация возможности визуализации данных систем *in vivo*, используя современные методы диагностики, такие как МРТ, флуоресцентная томография, оптоакустическая проточная цитометрия и томография, оптическая когерентная томография и т.д.; 5) обеспечение сенсорной функции; 6) дистанционное высвобождение инкапсулированного вещества в заданном месте в заданное время. Данные объекты являются инструментами нового направления медицины - тераностики, которая специализируется на комплексном решении терапевтических и диагностических задач. К методам, позволяющим получать такие частицы, относятся метод последовательной адсорбции [1-3], метод индуцированной кристаллизации адсорбции [2-5], и их комбинация [4]. Показано, что наличие неорганических наночастиц и/или органических красителя в составе структур ядро-оболочка и микрокапсул, позволяет визуализировать оптоакустическим методом [6-13]. Ядро может быть в газообразной [6,7], жидкой [8] и твердой фазе [9]. Наличие жидкого или газообразного ядра обеспечивает ультразвуковой контраст [7,8].

Установлено, что оптоакустический сигнал от капсул определяется концентрацией вещества, поглощающего лазерное излучение, и его расположение в капсуле (полимерной оболочке/внутреннем объеме капсул)

[1,3,10,13]. Наличие наночастиц оксида железа позволяет обеспечить визуализацию частиц методами ОА визуализации и МРТ [8,12]. Кроме того, присутствие наночастиц оксида железа в составе капсул позволяет использовать магнитное поле для их управляемой агрегации и перемещения [5]. МРТ контраст изображения микрокапсул, содержащих наночастицы оксида железа, можно изменять варьируя среднее значение между наночастицами оксида железа в нанокompозитной оболочке [11], а оболочку капсул можно разрушать с помощью УЗ воздействия [12,13].

Полученные наноструктурированные частицы совместно с современными методами фотоники и акустики, которые уже стали привычными, как для доклинических, так и клинических исследований, могут быть использованы для создания новых систем доставки лекарств, комбинирующих такие функциональности, как навигация, визуализация, *in vivo* мониторинг биохимических процессов, активированное дистанционно высвобождение биоактивных веществ *in vivo* в зависимости от значений параметров, характеризующих состояние пациента.

Настоящая работа поддержана Программой «Клевер»: Совместные проекты Сколтеха, МФТИ и ИТМО

Ссылки

1. M.D. Mokrousov et al, Biomedical Optical Express, 10, 9, 2019, 4775-4789
2. M.V. Novoselova et al, Colloids and Surface B: Biointerfaces, 181, 2019, 680-687
3. M.D. Mokrousov et al, Biomedical Optics Express, 2021, 12(6), 3181-3195
4. S.V. German et al, Scientific Reports, 2018, 8(1), 17763
5. E.S. Vavaev et al, ACS Applied Nano Materials, 2022 5 (2), 2994-3006
6. J. Mujtaba et al, Advanced Materials, 2021, 2007456(1-40)
7. R.A. Barmin et al, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2022, 219, 112856
8. E.A. Maksimova et al, Laser & Photonics Reviews, 2023, just accepted
9. R. E. Noskov et al, Adv. Mater. 2021, 2008484
10. M.V. Novoselova et al, Photoacoustics, 2020, 100186
11. S.V. German et al, Phys. Chem. Chem. Phys., 2016, 18, 32238-32246
12. M.V. Novoselova et al, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2023, 47, 102612
13. M.V. Novoselova et al, Colloids and Surfaces B, 2021, 111576

Мониторинг ответа опухолевых клеток на химиотерапевтическое воздействие в присутствии коллагена с помощью комбинации оптических методов

И.Н. Дружкова¹, Е.Э. Никонова^{2,3}, А.Д. Комарова^{1,4}, А.М. Можеров¹, Н.И. Игнатова¹, И.Г. Корякина⁵, М.В. Зюзин⁵, В.А. Байгильдин⁶, Ю.Р. Шакирова⁶, У.А. Лисица¹, Е.А. Ширшин^{2,3}, В.И. Щеславский¹, С.П. Туник⁶, М.В. Ширманова¹

¹Институт экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий, Приволжский исследовательский медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Россия

²Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

³Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

⁴Институт биологии и биомедицины, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

⁵Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

⁶Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Ключевые слова — *клеточный метаболизм; внутриклеточный pH; FLIM; PLIM; межклеточный матрикс*

I. ВВЕДЕНИЕ

В этом исследовании мы сравнили эффективность химиотерапевтических препаратов против раковых клеток *in vitro* на моделях с коллагеном и без него. Исследовали влияние препаратов на клеточный метаболизм и внутриклеточный pH (pHi). Для этого использовалась комбинация оптических методов: визуализация коллагена с помощью генерации второй гармоники (ГВГ), многофотонная флуоресцентная микроскопия для визуализации распределения доxorубина (DOX), визуализация времени жизни флуоресценции (FLIM) редокс-кофактора НАД(Ф)Н [2] и визуализация времени жизни фосфоресценции (PLIM) сенсора pHi. Изменения pHi оценивали с помощью нового pH-чувствительного зонда BC-Ga-Ir [3].

II. РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы исследовали распределение DOX в присутствии коллагена различной структуры в трехмерных моделях на основе коллагена. Кроме того, мы одновременно отслеживали изменения pHi и метаболизма в живых клетках колоректального рака в коллагене и без коллагенового матрикса *in vitro* при лечении FOLFOX.

Было обнаружено, что жизнеспособность различных типов раковых клеток повышалась в присутствии коллагена. Коллаген замедлял диффузию DOX и, таким образом, снижал поглощение препарата клетками. Помимо ядер, DOX также воздействует на митохондрии, что приводит к ингибированию окислительного фосфорилирования,

которое более выражено в клетках, растущих в отсутствие коллагена. Было обнаружено, что воздействие препаратов, входящих в схему FOLFOX, вызывало раннее внутриклеточное закисление (снижение pHi) с последующим сдвигом к более щелочным значениям. Воздействие препаратов приводило к сдвигу в сторону окислительного фосфорилирования, но в отсутствие коллагена изменения были более выраженными.

В совокупности наши данные показывают, что коллаген, входящий в состав межклеточного матрикса, способствует гетерогенному и неоптимальному ответу на исследуемые химиотерапевтические препараты, и подчеркивают проблемы в улучшении доставки и эффективности лекарств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] M. Najafi et al. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *Journal of cellular biochemistry* 120, 2782-2790 (2019).

[2] M. Shirmanova et al. Exploring Tumor Metabolism with Time-Resolved Fluorescence Methods: From Single Cells to a Whole Tumor // Chapter 3 in *Multimodal Optical Diagnostics of Cancer*; Tuchin, V., Popp, J., Zakharov, V., Eds, pp. 133-155 (2020).

[3] J.R. Shkairova et al. Intracellular pH Sensor Based on Heteroleptic Bis-Cyclometalated Iridium (III) Complex Embedded into Block-Copolymer Nanospecies: Application in Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Advanced Functional Materials* 33, 2212390 (2023).

Флуоресцентная спектроскопия кожи человека: возможности и ограничения

А.В. Дунаев

ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», Орёл, Россия

Аннотация — Описаны существующие возможности, ограничения и перспективы применения флуоресцентной спектроскопии кожи человека при решении различных диагностических задач практической медицины.

Ключевые слова — кожа человека; флуоресцентная спектроскопия; мультимодальная оптическая диагностика; портативные устройства

I. ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия для диагностики метаболических процессов в биологических тканях все большую популярность приобретают методы флуоресцентной спектроскопии (ФС) и визуализации. В клинической практике для диагностики патологических изменений в биологических тканях методом ФС оценивают различия в параметрах интенсивности или спектрального состава сигнала флуоресценции от нормальных и патологических тканей. К числу веществ, обладающих выраженной автофлуоресценцией, в биологических тканях относят коферменты восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД), структурные белки коллаген и эластин, аминокислоты триптофан и тирозин, а также порфирины, липофусцин и меланин. Использование флуоресцентных методов позволяет обнаруживать биохимические изменения в тканях, связанные с патологическими метаболическими перестройками. Целью данной работы явилось продемонстрировать возможности и ограничения ФС кожи человека при решении различных диагностических задач практической медицины.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На протяжении более 10 лет в НТЦ биомедицинской фотоники ОГУ имени И.С. Тургенева разрабатываются методы и устройства с применением ФС кожи человека для различных областей медицины – эндокринологии, дерматологии, онкологии, реабилитологии, сомнологии, космической медицины [1-4]. Накопленный клинический опыт (всего исследовано более 300 пациентов) показал, что диагностическая значимость ФС повышается при мультимодальном подходе, заключающемся в одновременной регистрации медико-биологических параметров с помощью других оптических методов (например, лазерной доплеровской флоуметрии, спектроскопии диффузного отражения, рамановской спектроскопии и др.) и дальнейшем совместном анализе полученных данных.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведен анализ долговременной индивидуальной вариабельности эндогенной флуоресценции флуорофоров – НАДН и ФАД. Установлено, что одним из главных факторов, влияющих на разброс результатов измерений, является уровень кровенаполнения биоткани, который необходимо учитывать при интерпретации данных в диагностике [2]. В клинических условиях получены данные по различию накопления конечных продуктов гликирования в биоткани у пациентов с сахарным диабетом 2-ого типа по отношению к условно здоровым волонтерам [3]. Разработанный на основе мультимодального подхода метод, основанный на ФС и лазерной доплеровской флоуметрии, позволяет классифицировать состояние биотканей на классы отсутствия, наличия или более тяжелой формы микроциркуляторно-метаболических нарушений с вероятностью ложноотрицательного результата диагностики менее 0,2. Благодаря реализации канала ФС в портативном варианте впервые удалось зарегистрировать амплитуду интенсивности флуоресценции кофермента кожи НАДН (при возбуждении на длине волны 365 нм) в условиях невесомости, что позволяет оценивать изменения окислительного метаболизма биоткани.

IV. ВЫВОДЫ

Одновременная регистрация спектров флуоресценции совместно с другими методами биофотоники на основе мультимодального подхода несет информацию о метаболических процессах и морфологической структуре тканей. Одним из перспективных направлений применения ФС в медицине является разработка портативных устройств для оценки окислительного метаболизма биотканей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] А.В. Дунаев, Мультимодальная оптическая диагностика микроциркуляторно-тканевых систем организма человека, ТНТ: Старый Оскол, 2022, 440 с.
- [2] Е.А. Жеребцов, В.В. Дрёмин, А.И. Жеребцова, Е.В. Потапова, А.В. Дунаев, Флуоресцентная диагностика митохондриальной функции в эпителиальных тканях *in vivo*, ОГУ имени И.С. Тургенева: Орёл, 2018, 107 с.
- [3] A.V. Dunaev, V.V. Tuchin (Eds.), Biomedical Photonics for Diabetes Research, Taylor & Francis Group LLC, CRC Press: Boca Raton, FL, 2022, 287 p.
- [4] V. Dremine, S. Sokolovski, E. Rafailov, E. Zharkikh, E. Potapova, A. Dunaev, E. Zharebtsov, In vivo fluorescence measurements of biological tissue viability, Advanced Photonics Methods for Biomedical Applications, Taylor & Francis Group LLC, CRC Press: Boca Raton, FL, 2023, pp. 1-37

Использование программных методов анализа конфокальных изображений микроглии в гиппокампе мышей при системном воспалении и физиологическом старении

О.Г. Заборская¹, О.М. Широкова¹, И.В. Мухина¹

¹ «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

В данном исследовании при помощи специализированных плагинов в ImageJ оценивались морфометрические характеристики микроглии у самцов мышей линии C57BL/6 в модели физиологического старения и в моделях острого и хронического липополисахарид (ЛПС)-индуцированного воспаления. В результате проведения фрактального анализа было показано, что наименьшей фрактальной размерностью, а, следовательно, сложностью формы обладала микроглия с острым и хроническим введением ЛПС. При этом, наименьшей плотностью ветвления обладала группа с моделью физиологического старения. При анализе цитоскелета, группы с воспалением, так же, как и группа старых животных имели достоверно меньшее количество отростков, а также наименьшую суммарную длину отростков.

Ключевые слова — нейровоспаление; нейродегенерация; ЛПС; иммуногистохимия; конфокальная микроскопия.

I. ВВЕДЕНИЕ

Известно, что при физиологическом старении так же, как и при внедрении воспалительных агентов в организм, профиль морфологических характеристик микроглиальной популяции клеток мозга характеризуется преобладанием провоспалительного фенотипа микроглии [1]. Однако многие структурные и функциональные особенности провоспалительной и стареющей микроглии в значительной степени остаются до сих пор неизвестными. В связи с чем необходим более детальный скрининг микроглии при патологических состояниях, ассоциированных с возрастом и системным воспалением.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Для исследования были использованы самцы лабораторных мышей линии C57BL/6. Внутривентрикулярное введение ЛПС осуществлялось в дозировке 0,5 мг/кг 1 раз в неделю в течение 4 недель группе с хроническим введением и однократно в дозировке 5 мг/кг для группы с острым введением. В качестве групп сравнения были выбраны 4х-месячные животные с хроническим внутривентрикулярным введением физиологического раствора (контроль) и группа 18-месячных животных той же линии.

ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ МАРКИРОВАНИЕ МИКРОГЛИИ И АНАЛИЗ ИЗОБРАЖЕНИЙ

Для оценки активации микроглиальных клеток мозга мышей производилось иммуногистохимическое маркирование свободноплавающих срезов мозга (35 мкм) в СА3 области гиппокампа. В качестве маркера микроглии использовалось первичное антитело к Iba-1, а в качестве вторичного антитела использовался флуоресцентный краситель Alexa Fluor 555. Изображения получали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа ZEISS LSM 700.

Для анализа полученных микрофотографий использовались плагины ImageJ AnalyseSkeleton (2D/3D) и FracLac.

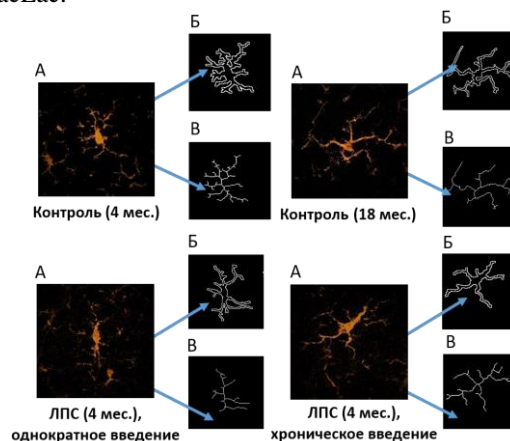


Рис.1 Репрезентативные изображения микроглиальной клетки на конфокальной фотографии (40x)
(А) Исходное изображение микроглии
(Б) Бинарное изображение для фрактального анализа
(В) Скелетированное изображение для анализа цитоскелета

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Kwon H. S., Kon S. H. "Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the rules of microglia and astrocytes", *Translational neurodegeneration*, vol. 9, №. 1, 2020, pp. 1-12

Интраоперационная диагностика околощитовидных желез методами оптической спектроскопии с применением оптоволоконного зонда

Н.В. Злобина^{1,2}, П.С. Церегородцева^{1,2}, Г.С. Будылин³, Л.С. Урусова², И.В. Ким², Э.Э. Порубаева², А.В. Воротников^{1,2}, Н.В. Пачуашвили², Н.Г. Мокрышева², Е.А. Ширшин^{1,2}

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Москва, Россия

³ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Аннотация — Исследованы возможности методов оптической спектроскопии для идентификации и оценки жизнеспособности паращитовидной железы во время хирургического вмешательства.

Ключевые слова — околощитовидная железа; инфракрасная флуоресценция; спектроскопия диффузного отражения

I. ВВЕДЕНИЕ

Оптические методы находят широкое применение в исследовании различных живых систем, в том числе и человека. Одним из актуальных направлений в данной области является оптическая интраоперационная диагностика, которая позволяет хирургу получать дополнительную информацию о локализации и свойствах патологических объектов прямо во время операции. Ряд методов оптической навигации находит применения в задачах эндокринологии, например, для обнаружения и определения состояния околощитовидной железы (ОЩЖ) во время операции.

В последние годы для интраоперационной идентификации ОЩЖ активно проводились исследования метода, основанного на измерении инфракрасной флуоресценции ОЩЖ [1]. Также важен вопрос об оценке жизнеспособности ОЩЖ непосредственно во время операции. Текущий метод определения жизнеспособности ОЩЖ обычно основан на визуальном осмотре и пальпации хирургом, что в значительной степени зависит от его опыта [2].

В данной работе исследовалось применение двух зондовых методов, основанных на спектроскопии диффузного отражения (СДО) и флуоресцентной спектроскопии в ближней инфракрасной (БИК) области, как для определения местоположения ОЩЖ, так и для оценки их жизнеспособности.

II. РЕЗУЛЬТАТЫ

Измерения были проведены на 21 операции по удалению щитовидной железы (ЩЖ).

Было показано, что изменение уровня паратиреоидного гормона в крови коррелирует с изменением индекса оксигенации ОЩЖ, определяемого с помощью метода СДО (рис.1а). В рамках исследования была проведена бинарная классификация для идентификации ОЩЖ по спектрам флуоресценции, и было показано, что метод СДО совместно с флуоресцентной спектроскопией в ИК диапазоне позволяет эффективно отличать ОЩЖ от других типов тканей (рис.2б).

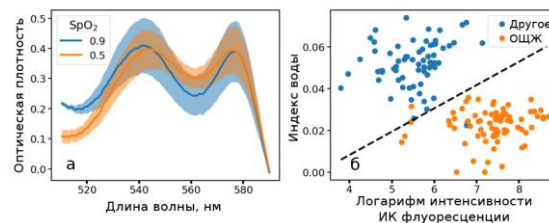


Рис. 1. А - Спектры оптической плотности ОЩЖ с одной из операций до и после удаления ЩЖ. В легенде отмечены значения рассчитанные значения оксигенации для средних спектров. Уровень паратиреоидного гормона упал с 69 до 24 единиц. Б – Зависимость индекса воды, рассчитанного из спектров эффективной оптической плотности, от логарифма интенсивности ИК флуоресценции для ОЩЖ и других тканей (ЩЖ, мышцы).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] R. Tjahjono, K. Nguyen, D. Phung, F. Riffat, and C.E. Palme, "Methods of identification of parathyroid glands in thyroid surgery: a literature review," ANZ Journal of Surgery, vol. 91, №9, pp.1711-1716, 2021.
- [2] M. Abbaci, F. De Leeuw, I. Breuskin, O. Casiraghi, A.B. Lakhdar, W. Ghanem, C. Laplace-Builhé and D. Hartl, "Parathyroid gland management using optical technologies during thyroidectomy or parathyroidectomy: A systematic review," Oral Oncol, vol. 87, pp.186-196, 2018.

Резонансные диэлектрические наночастицы для оптического нагрева и термометрии в клетках

М.В.Зюзин¹, Е.Н Герасимова¹

¹Физический факультет, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

В этом исследовании представлены два инновационных метода точного мониторинга температуры, которые могут значительно снизить риск повреждения клеток и тканей от перегрева. Мы фокусируемся на таких технологиях как оптически детектируемый магнитный резонанс и сдвиг комбинационного рассеяния света для измерения температуры в режиме реального времени во время доставки биоактивных соединений и фототермической терапии.

Ключевые слова — золотые наночастицы, NV-центры, кремниевые наночастицы, ФТТ

Поддержание правильной температуры является ключевым фактором для контроля клеточных функций и процессов [1]. Неконтролируемое повышение температуры во время лечения, например, при фототермической терапии, может привести к нарушению метаболизма, роста и выживания клеток [2]. Чтобы минимизировать эти риски, в нашем исследовании предлагается использовать наноструктуры, которые играют роль нанотермометров и обеспечивают точный контроль температуры на клеточном уровне.

В нашем первом исследованном методе применяется оптически детектируемый магнитный резонанс (ОДМР), присущий наноалмазам с азото-замещённой вакансией (NV-центрами) [3]. Изменение температуры приводит к деформации кристаллической решетки наноалмаза и в результате чего частота парамагнитного резонанса электрона NV-центра смещается, что может быть определено с помощью ОДМР и позволяет осуществлять точный мониторинг температуры. При совмещении золотых наночастиц, играющих роль нагревательных агентов, и NV-центров как нанотермометров в один носитель, можно создать систему для контролируемой фотоиндуцированной доставки биоактивных веществ с одновременным мониторингом температуры. Мы показали, что расположение золотых наночастиц и их концентрация в носителях влияют на требуемую плотность мощности лазера для разрыва носителя, однако температура разрушения носителя остается прежней [5].

Второй изучаемый метод заключается в измерении температуры по сдвигу комбинационного рассеяния света. В нашем исследовании был показан потенциал оптически резонансных диэлектрических наночастиц α -Fe₂O₃ и кремниевых (Si) наночастиц в сочетании с золотыми (Si-Au) нанокластерами, для применения в качестве нанотермометров. В одной из наших работ наночастицы α -Fe₂O₃ способные нагреваться под воздействием света, были

загружены в носители для доставки, что позволило осуществить одновременно процесс высвобождения лекарств и измерение температуры.

Кроме того, мы провели исследования по использованию кремниевых (Si) и кремниево-золотых (Si-Au) наночастиц для задач оптической гипертермии клеток. Для применения Si наночастиц в роли оптических нагревателей необходимо, чтобы они имели узкое распределение по размеру для соблюдения необходимых резонансных условий. Однако обычно наночастицы Si, получаемые методом лазерной абляции, отличаются полидисперсностью. Чтобы решить данную проблему, мы разработали новую гибридную систему, объединяющую плазмонные (Au) и диэлектрические (Si) наноструктуры, с улучшенными свойствами для оптического нагрева и мониторинга температуры в реальном времени внутри клеток. Наши результаты показали, что гибридные Si-Au наночастицы более эффективны в процессе оптической гипертермии в биологических средах.

Таким образом, точное измерение температуры на клеточном уровне может повысить эффективность и безопасность современных медицинских методов лечения. Для полной разработки и проверки этих методов необходимы дальнейшие *in vivo* исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [3] M. Quintanilla, M. Henriksen-Lacey, C. Renero-Lecuna, and L. M. Liz-Marzán, 'Challenges for optical nanothermometry in biological environments', *Chem Soc Rev*, vol. 51, no. 11, pp. 4223–4242, 2022
- [4] C. Bradac *et al.*, 'Optical Nanoscale Thermometry: From Fundamental Mechanisms to Emerging Practical Applications', *Adv Opt Mater*, vol. 8, no. 15, p. 2000183, 2020
- [5] G. Kucsko *et al.*, 'Nanometre-scale thermometry in a living cell', *Nature*, vol. 500, no. 7460, pp. 54–58, 2013
- [6] E. N. Gerasimova *et al.*, 'Real-Time Temperature Monitoring of Photoinduced Cargo Release inside Living Cells Using Hybrid Capsules Decorated with Gold Nanoparticles and Fluorescent Nanodiamonds', *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 13, no. 31, pp. 36737–36746, 2021
- [7] G. P. Zograf, G. P. Zograf, M. I. Petrov, S. V. Makarov, Y. S. Kivshar, and Y. S. Kivshar, 'All-dielectric thermonanophotonics', *Advances in Optics and Photonics*, Vol. 13, Issue 3, pp. 643-702, vol. 13, no. 3, pp. 643–702, 2021.
- [8] G. P. Zograf *et al.*, 'All-Optical Nanoscale Heating and Thermometry with Resonant Dielectric Nanoparticles for Controllable Drug Release in Living Cells', *Laser Photon Rev*, vol. 14, no. 3, p. 1900082, 2020
- [9] E. N. Gerasimova *et al.*, 'Single-Step Fabrication of Resonant Silicon-Gold Hybrid Nanoparticles for Efficient Optical Heating and Nanothermometry in Cells', *ACS Appl Nano Mater*, vol. 6, no. 20, pp. 18848–18857, 2023

FLIM для трансляционных исследований в регенеративной медицине

А.В. Кашина¹, А.С. Каширина¹, Э.Б. Дашинимаев², Е.П. Калабушева³, П.С. Ермакова¹, С.А. Родимова¹, Д.С. Кузнецова¹, Н.В. Бобров⁴, В.Е. Загайнов^{1,5}, Е.В. Загайнова^{1,6}

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия

²НИИ трансляционной медицины РНИМУ им. Н.И.Пирогова, Москва, Россия

³Институт биологии развития РАН, Москва, Россия

⁴ПОМЦ ФМБА, Нижний Новгород, Россия

⁵ГАУЗ НО НИИКО «Нижегородский областной клинический диспансер», Нижний Новгород, Россия

⁶Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина, Москва, Россия

FLIM в сочетании с эндогенными маркерами является мощным инструментом для решения многих задач регенеративной медицины.

FLIM; метаболизм; стволовые клетки; островки Лангерганса; патология печени; регенерация.

I. ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентная микроскопия с детекцией времени жизни (FLIM), позволяющая проводить количественный многопараметрический анализ в реальном времени, является новым подходом к биовизуализации в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Используя как эндогенные, так и экзогенные флуорофоры, FLIM может отслеживать многочисленные процессы в клетках и тканях, включая прогрессирование заболевания и эффективность терапии. В сочетании с 3D-моделями, полученными из стволовых клеток (СК), FLIM позволяет отслеживать их дифференцировку и контролировать метаболический статус. FLIM подход может быть успешно использован для *in vivo* мониторинга на моделях животных и пациентах для эффективных клинических исследований различных патологий и процессов регенерации.

II. РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффективный контроль структурных и функциональных изменений во время дифференцировки СК представляет собой большую проблему из-за сложной взаимосвязи между различными сигнальными путями, внеклеточным микроокружением и метаболическими потребностями клеток. FLIM в сочетании с эндогенными маркерами позволяет неинвазивно и долговременно изучать изменения клеточного метаболизма как в двух-, так и в трехмерных условиях (приближенных к *in vivo*). Так, проведен сравнительный анализ с использованием FLIM метаболического статуса дермальных сфероидов, созданных из клеток дермальной папиллы, дифференцированных из СК (iDP), и нативных клеток дермальной папиллы (hDP). Выявлено, что клетки iDP-сфероидов характеризовались более гликолитическим фенотипом по сравнению с клетками hDP. Более того, метаболическая активность iDP в сфероиде зависела от источника СК, из которого они были получены. Изучен

метаболический статус клеток, дифференцированных из СК, несущих мутацию синдрома Дауна (TS21), с применением FLIM. Было продемонстрировано преобладание гликолиза в сфероиде TS21 по сравнению со сфероидом нормального кариотипа (NK). Таким образом, метаболический статус может выступать как параметр оценки качества дифференцировки, а также развития патологии в трехмерных клеточных моделях. Проблема экспресс-оценки жизнеспособных и метаболически активных островков Лангерганса поджелудочной железы без разрушения 3D структуры и без использования экзогенных красителей до сих пор не решена. В данном исследовании был разработан метод оценки, основанный на FLIM и НАД(Ф)Н, для неинвазивной и безконтрастной оценки качества изолированных островковых клеток. При стимуляции глюкозой изолированные островки характеризовались типичными для НАД(Ф)Н временами жизни флуоресценции, что указывает на сохранение их жизнеспособности и метаболически активного статуса после выделения. Современные клинические методы оценки состояния печени недостаточно эффективны для прогнозирования эффективности регенерации печени после резекции. С использованием бесконтрастных методов мультифотонной микроскопии были выявлены оптические признаки развития патологии и снижения регенераторного потенциала печени. Методом FLIM для стеатоза и фиброза показано отсутствие резкого увеличения значений a_2 и a_3 на 3 день регенерации, что не соответствует условиям успешной регенерации. Выявленные оптические признаки могут быть транслированы в медицину для интраоперационной экспресс-оценки состояния печени для планирования объема резекции. Таким образом, FLIM в сочетании с эндогенными маркерами является мощным инструментом для решения многих задач регенеративной медицины. Развитие технологий, анализа и приложений FLIM будет способствовать дальнейшему продвижению биологических и клинических исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РФФ № 24-65-00044.

Лазерная, микроспектральная, и мультифотонная техника для современных исследований в биофизике и биомедицине, в области конфокальной оптики и спектроскопии, включая эксперименты высокого разрешения

Д. А. Козодаев¹, М. А. Трусов¹

¹ООО «АКТИВНАЯ ФОТОНИКА», Москва, Зеленоград, Россия

Аннотация - Мы представляем на конференции новейшее научное оборудование для оптических спектральных и комбинированных зондово-оптических исследований с наномасштабным пространственным разрешением.

Ключевые слова - Микроспектральная техника, комбинационное рассеяние, фотолюминесценция, зондово-оптические методики, зондовое усиление, лазеры, детекторы

Мы представляем на конференции «Флуоресценция для биомедицины» новейшее научное оборудование для оптических и комбинированных зондово-оптических исследований с наномасштабным пространственным разрешением производства Группы компаний «НТ-МДТ», одного из ведущих разработчиков оборудования для наноспектроскопии, а также других научных инструментов высокого класса для экспериментальных исследований в области нанофотоники.

Наша команда разработала высоко-профессиональную зондово-спектральную измерительную систему нового поколения, в которой конструктивно предусмотрена максимально гибкая архитектура и заложено множество возможностей для реализации самых сложных научных экспериментов, как в оптической спектроскопии так и в зондовой наноскопии, включая измерения спектров фотолюминесценции, комбинационного рассеяния, и более сложных процессов электромагнитных взаимодействий.

Оптическая и спектральная части нашей измерительной системы изначально спроектированы под удобную интеграцию с атомно-силовым микроскопом, и позволяет довольно легко выйти на режим зондового усиления спектрального сигнала, типа TERS и TEPL [1]. Тем самым становится возможным обеспечить наивысшее пространственное (латеральное и аксиальное) разрешение при спектральных измерениях. Далее функциональность системы может быть расширена в область реализации мульти-фотонных процессов, например методом CARS (см., например, книгу [2]), в том числе с высоким

временным разрешением, с возможностью построения гиперспектральных карт нелинейных зондово-оптических взаимодействий. Такого рода эксперименты очень популярны в последние годы в различных задачах биофизики и биомедицины.

Наша команда уже разработала и самостоятельно выпускает твердотельные термостабилизированные лазеры видимого и ближнего ИК диапазона для рамановской и фотолюминесцентной спектроскопии стационарных состояний, которые можно использовать как с техникой нашего производства, так и с приборами сторонних производителей.

Одним из ключевых компонентов любой микроспектральной системы является спектральный детектор. При этом требования ко всем компонентам детектора современными спектроскопистами предъявляются весьма жесткие, как в части качества изготовления самого чипа, так и в части работы системы охлаждения, уровня вакуумирования, и, разумеется в части скорости работы и шумов управляющей электроники детектора.

Наша команда не так давно инициировала перспективный проект по собственному производству охлаждаемых малошумящих ПЗС камер видимого диапазона для спектральной техники, включая электронику и управляющее ПО. Мы уже вышли на серийное производство ПЗС камер, и предполагаем, что они будут применяться не только со спектральными приборами нашего производства, но и в других сложных оптических экспериментах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [10] L. Novotny, B. Hecht. Principles of Nano-optics, 2nd ed.. Cambridge Univ. Press (2007).
- [11] W. Demtroeder. Laser Spectroscopy: Basic concepts and instrumentation, 3rd ed.. Springer (2003).

Комплексная оценка метаболизма и оксигенации опухолей методами время-разрешенного оптического имиджинга

А.Д. Комарова^{1,2}, С.Д. Синюшкина¹, Л.Н. Бочкарев³, И.Н. Дружкова¹, В.И. Щеславский¹, М.В. Ширманова¹

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

² Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

³ Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН, Нижний Новгород, Россия

Аннотация — В этом исследовании мы разработали протоколы для одновременной визуализации метаболизма и кислорода в моделях опухолей *in vitro* и *in vivo* методами флуоресцентной и фосфоресцентной микроскопии с временным разрешением. Представленное здесь сочетание методов FLIM/PLIM станет ценным подходом для комплексной оценки метаболизма и оксигенации опухолей и более глубокого понимания механизмов резистентности и проверки новых препаратов, нацеленных на гипоксию опухоли или метаболические пути в доклинических исследованиях.

Ключевые слова — флуоресцентная микроскопия с временным разрешением; сенсоры на кислород; метаболизм; опухоль; гипоксия.

I. ВВЕДЕНИЕ

Опухолевые клетки способны адаптироваться к переменному содержанию кислорода и гипоксии за счет переключения между метаболическими путями. Однако регуляторное влияние кислорода на метаболизм и его вклад в метаболическую гетерогенность опухолей изучены недостаточно. Оптические методы с временным разрешением PLIM (Phosphorescence lifetime imaging) и FLIM (Fluorescence lifetime imaging) позволяют неинвазивно изучать кислородный и метаболический статус опухолей в режиме реального времени. Актуальной задачей является комплексная оценка метаболизма и оксигенации опухолей в моделях *in vitro* и *in vivo*.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены на опухолевых клетках СТ26 (колоректальный рак мыши) в модели монослоя клеток, 3D-сфероидов и опухолях *in vivo*. В качестве кислородного сенсора использовали фосфоресцирующие полимерные мицеллы на основе Ir(III) – PIr3[1]. Микроскопические исследования проводили с использованием лазерного сканирующего микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного модулем FLIM/PLIM на базе TCSPC (время-коррелированный счет одиночных фотонов). Фосфоресценцию PIr3 возбуждали в двухфотонном режиме на длине волны 750 нм, детектировали сигнал в диапазоне 600–740 нм.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект № 24-19-00618.

Метаболический статус оценивали методом FLIM по автофлуоресценции метаболического кофактора НАД(Ф)Н: возбуждение на длине волны 750 нм и детекция в диапазоне 450–490 нм. Мощность возбуждения лазера на образце составляла 6 мВт, время накопления сигнала — 120 с.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы были выбраны параметры визуализации фосфоресценции сенсора PIr3 на лазерном сканирующем микроскопе в опухолевых клетках [1]. Далее была разработана и протестирована методика одновременного FLIM/PLIM имиджинга на монослое опухолевых клеток, 3D опухолевых сфероидов и опухолях мышей [2]. Было продемонстрировано, что в монослое опухолевых клеток отсутствует гетерогенность кислорода и метаболизма – метаболические параметры высоко коррелировали с уровнем кислорода при его изменении ($r=0,73$). В сфероидовых внутренних слоях клеток был более гипоксичным по сравнению с внешним слоем. Также наблюдались метаболические различия между внешним и внутренним слоями. Опухоли мышей *in vivo* имели высокую внутриопухольевую и межопухольевую гетерогенность по кислородному и метаболическому статусам. В опухоли корреляция между метаболическими параметрами и содержанием кислорода была умеренной, что свидетельствует о вкладе других факторов, кроме кислорода, в регуляцию метаболизма клеток. Разработанная методика комплексной оценки метаболизма и оксигенации опухолей методами FLIM/PLIM микроскопии является перспективной в доклинических исследованиях влияния гипоксии на метаболические аспекты прогрессирования опухоли и ответа на лечение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Parshina, Y.P., et al. "Simultaneous Probing of Metabolism and Oxygenation of Tumors In Vivo Using FLIM of NAD(P)H and PLIM of a New Polymeric Ir(III) Oxygen Sensor," *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 10263. <https://doi.org/10.3390/ijms231810263>
- [2] Komarova A. D. et al. *Oxygen Assessment in Tumors In Vivo Using Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy // Hypoxia: Methods and Protocols.* – New York, NY : Springer US, 2024. – С. 91-105.

Генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры для *in vivo*

А.И. Костюк^{1,2}, А.Д. Сергеева^{1,3}, Ю.В. Храмова^{4,1}, В.А. Катруха¹, В.В. Чебаненко¹, А.Е. Носова¹, Н.А. Петрунина^{1,3}, Л.Л. Наумов^{1,4}, К.В. Васильева¹, М.С. Почечуев⁴, А.С. Чеботарев⁴, А.А. Ланин^{4,5}, И.В. Федотов^{4,5}, А.Б. Федотов^{4,5}, А.Б. Тяглик^{1,4}, А.А. Федотова^{4,1}, К.И. Морозова⁴, А.В. Семьянов^{1,4}, Н.А. Браже^{4,1}, В.В. Белоусов^{1,2,3,6}, Д.С. Билан^{1,2,3}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

³Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Россия

⁴Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵Российский Квантовый Центр, Сколково, Москва, Россия

⁶LIFT-центр, Сколково, Москва, Россия

Генетически кодируемые биосенсоры на основе флуоресцентных белков представляют собой современный мощный инструмент для проведения медико-биологических исследований в системах *in vivo*. Биосенсор данного типа кодируется геном, который можно доставить практически в любую систему исследования. Многие биологические процессы в норме и патологии характеризуются образованием высокореактивных соединений, время жизни которых в живых клетках ограничено и может составлять менее секунды. Подход исследования динамики процессов с участием таких соединений в живых целостных системах в режиме реального времени с применением генетически кодируемых биосенсоров во многих случаях безальтернативен.

Ключевые слова — генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры; окислительный стресс; воспаление; ишемия.

Генетически кодируемые биосенсоры являются белковой химерной молекулой, состоящей из нескольких доменов. Наиболее распространена структура биосенсора, которая имеет сенсорный домен, отвечающий за взаимодействие биосенсора с конкретным внутриклеточным параметром, и интегрированный с ним флуоресцентный белок, визуализирующий это взаимодействие. Динамика флуоресцентного сигнала в системе отражает динамику анализируемого параметра. Выбор локализации биосенсора можно осуществлять как на уровне типа клеток и тканей, подбирая нужный промотор, так и на уровне внутриклеточных органелл, добавляя к гену биосенсора специфичные сигнальные последовательности.

В настоящем докладе представлены новые типы биосенсоров, недавно разработанные нашей командой. Среди них биосенсоры для регистрации динамики активных форм галогенов – важных медиаторов воспалительных реакций как при нормальном функционировании иммунных

клеток, так и при развитии заболеваний, сопровождающихся острым или хроническим воспалением. Также в докладе будут представлены биосенсоры, позволяющие исследовать динамику активных форм кислорода и серы.

Главное преимущество генетически кодируемых биосенсоров для медико-биологических исследований заключается в возможности их применения в моделях *in vivo* на уровне организмов. В своей работе мы исследовали *in vivo* динамику ацидоза и некоторых редокс-параметров в тканях головного мозга грызунов при развитии ишемического инсульта в острой фазе и с течением длительного времени. Мы также исследовали, как метаболические изменения клеток мозга влияют на динамику исследуемых параметров. В частности, мы установили, что гипергликемия существенно усугубляет последствия инсульта, но не через генерацию пероксида водорода. Регистрация динамики флуоресцентного сигнала в тканях мозга может быть реализована через оптические волокна, предварительно имплантируемые в глубокие слои мозга животных, а также через краниальные окна в черепе, что с использованием подходов мультифотонного возбуждения флуоресценции позволяет визуализировать в коре головного мозга события межклеточных взаимодействий на глубине до 500-800 мкм.

Широкую популярность приобретает объект рыба *Danio rerio* благодаря прозрачности тканей на ранних этапах развития, что привлекательно для оптических методов. Благодаря этой особенности с применением биосенсоров нам удалось оценить чувствительность клеток разных органов *D.rerio* к условиям гипоксии и последующей реоксигенации, а также визуализировать редокс-события при воспалительных процессах, вызванных бактериальной инфекцией, механическим и химическим повреждением различных тканей.

Фотосенсибилизированная люминесценция синглетного молекулярного кислорода: история открытия, механизмы, методы измерения, аналитические и биомедицинские применения

А.А. Красновский мл.

¹ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

Аннотация — Фотосенсибилизированная люминесценция (фосфоресценция) синглетного кислорода в растворах пигментов и красителей, впервые зарегистрированная автором этого доклада в 1976 г. (см. ссылки в обзорах [1-6]), широко применяется повсеместно как наиболее надежный метод изучения синглетного кислорода в химических и биологических системах. В докладе будет рассмотрена история открытия, механизмы, методы регистрации и аналитические и биомедицинские применения этого явления, а также наиболее частые проблемы.

Ключевые слова — фосфоресценция, синглетный кислород, время жизни, квантовый выход, применение в ФДТ, механизмы

I. ВВЕДЕНИЕ

Представление о фотосенсибилизированном образовании синглетного кислорода (СО) как первичной стадии фотодинамического действия красителей и основным первичным механизмом фотодинамической терапии опухолей трудно пробивало себе дорогу в науке в течение почти столетия (1883-1980). Для изучения проблемы были привлечены результаты исследования физики атмосферы, спектроскопии, квантовой физики и химии, а также экспериментальной фотохимии и фотобиологии. Вклад отечественной научной школы в развитие этих представлений очень велик и мало известен в нашей стране. Задача настоящего обзорного доклада состоит в том, чтобы в краткой форме суммировать эти данные, а также современные представления о люминесцентных исследованиях СО в химических и биологических системах.

II. ОБЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ПРИМЕНЕНИЯ

Люминесценция СО впервые наблюдалась при изучении реакции перекиси водорода с гипохлоридом натрия. Свечение возникало в пузырьках кислорода активно выделяющегося при реакции. В спектре хемиллюминесценции доминируют полосы мономерного и димерного кислорода. Люминесценция растворенного СО была первоначально обнаружена в аэрированных растворах пигментов при их фотовозбуждении в растворителях, не имеющих водородных атомов, используя прерывистое возбуждение, создаваемое механическим фосфороскопом. Главный максимум люминесценции - 1270 нм. Прочие

полосы фотоллюминесценции растворенного кислорода, которые позже также были выявлены, имеют на порядок величины меньшую относительную интенсивность, чем в случае хемиллюминесценции. В 1978-1980 гг. в работах школы Г.П. Гуриновича для возбуждения были использованы короткие вспышки импульсных ламп и лазеров, а также кинетические измерения, которые позволили измерять фосфоресценцию СО практически в любых средах. Позже для этой задачи нами были применены спектрометры с разрешенным во времени счетом фотонов (Красновский, Егоров, 1983-1988), а затем совместно с группой Коротева - техника время-коррелированного счета одиночных фотонов (Егоров, Камалов и др., 1988, 1989). Эта техника в сочетании с методическими приемами других групп позволила с высокой точностью исследовать кинетические параметры и квантовый выход люминесценции СО. В докладе планируется анализ этого материала. Особое внимание будет уделено измерениям в воде, живых клетках и тканях, а также тестированию фотосенсибилизаторов для ФДТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Красновский А.А., Krasnovsky, A.A., Jr. "Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions." Photochem. Photobiol., 1979, V. 29, No 1, p. 29-36
- [2] Красновский А.А., мл. "Синглетный молекулярный кислород и первичные механизмы фотодинамического действия оптического излучения". Итоги Науки и Техники. Современные проблемы лазерной физики. (ред. С.А. Ахманов, В.Б. Черняева) т. 3, с. 63- 135, 1990. ВИНТИ, Москва
- [3] Krasnovsky, A.A., Jr. "Phosphorescence studies of singlet oxygen in photobiochemical systems". Membrane and cell Biology, 1998, 12, No 5, 665-690.
- [4] A.A. Krasnovsky Jr. Luminescence and photochemical studies of singlet oxygen photonics. J. Photochem. Photobiol.: A: Chem. 2008, 196, No 2-3, 210-218.
- [5] A.A. Krasnovsky Jr. "Singlet oxygen and primary mechanisms of photodynamic therapy and photodynamic diseases". In: Photodynamic therapy at the cellular level. Research Signpost, Trivandrum-695 023, Kerala, India, A.B. Uzdensky-editor, p. 17-62, 2007
- [6] A. A. Krasnovsky, Jr. "Singlet molecular oxygen: Early history of spectroscopic and photochemical studies with contributions of A.N. Terenin and Terenin's school", J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 2018. V. 354, No 1-3, P. 11-24.

Спектроскопия комбинационного рассеяния света для изучения биodeградации германиевых наночастиц

Я.О. Кудряшова¹, Д.А. Назаровская¹, Я.В. Ломовская², А.А. Кудрявцев^{1,2,3}, Л.А. Осминкина^{1,3}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Физический факультет, Ленинские Горы, 1, 2, Москва, Россия

² Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН, ул. Институтская, 3, Пущино, Россия

³ Институт Биологического приборостроения РАН, ул. Институтская, 7, Пущино, Россия

Аннотация – В представленной работе разработана методика получения наночастиц германия путём механического измельчения монокристаллических пластин и с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света изучена их растворимость в модельных биологических жидкостях и живых клетках.

Ключевые слова - Германий; наночастицы; комбинационное рассеяние света (КР); Раман; биodeградация.

I. ВВЕДЕНИЕ

Кремниевые и германиевые наноматериалы представляют значительный интерес с точки зрения применения в биомедицине. Однако характеристики наночастиц германия (Ge НЧ) малоизучены. Например, известны лишь единичные исследования их цитотоксичности [1]. Об их биodeградации и способах изготовления также известно немного.

Спектроскопия КР основана на возбуждении колебаний молекулярных связей. Она активно используется для изучения свойств новых материалов; является неинвазивным, не требующим меток, методом биомедицины. Этот метод был выбран для изучения свойств Ge НЧ в представленной работе.

II. РАЗДЕЛ I

Разработана методика получения Ge НЧ путём механического измельчения монокристаллических пластин германия (с-Ge) в этаноле с использованием шаровой мельницы FRITSCH «Pulverisette 7 premium line».

Изучены характеристики полученных Ge НЧ: диаметр наночастиц составил 70 нм, Z-потенциал -34.5 мВ. Методом ИК-спектроскопии показано: полоса поглощения на 611 см^{-1} соответствует колебаниям растяжения связи Ge-S, а на 3100 см^{-1} - колебаниям O-H связи в молекуле воды. Оценена цитотоксичность полученных наночастиц при их инкубации 24 часа с клетками MCF-7, показано, что 50-процентная токсичная доза составляет около 100 мкг/мл.

На рис. 1 представлен спектр КР с-Ge и Ge НЧ. Максимум спектра с-Ge 300 см^{-1} соответствует фононам в

кристаллической решетке Ge. Незначительный сдвиг максимума для Ge НЧ на 298 см^{-1} свидетельствует о пространственном ограничении фононов в наночастицах. Плечо в спектре Ge НЧ на частоте около 260 см^{-1} объясняется аморфизацией образцов при их измельчении.

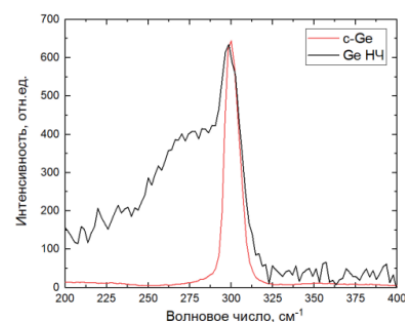


Рис. 1. Спектр КР кристаллического германия (с-Ge) и Ge наночастиц (Ge НЧ).

В работе исследована скорость растворения Ge НЧ в модельных биожидкостях и клетках методом спектроскопии КР. Показано, что при растворении наночастиц при их инкубации в PBS 37 С, или в живых клетках в течении 1-72 часов, происходит постепенное уменьшение интенсивности их КР спектров вплоть до полного исчезновения.

Полученные результаты открывают возможности использования Ge НЧ как биodeградируемых агентов для терапии и диагностики.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-15-00137, <https://rscf.ru/project/24-15-00137/>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Hu J. et al. Synthesis of fluorescent and water-dispersed germanium nanoparticles and their cellular imaging applications //Langmuir. – 2018. – V. 34. – №. 30. – P. 8932- 89

Изменение форм миоглобина в результате развития окислительных процессов под действием ультрафиолета

Е.А. Кузунова¹, У.А. Близнюк^{1,2,3}, А.П. Черняев^{1,3}, П.Ю. Борщеговская^{1,2,3}, И.А. Родин^{2,4}, М.И. Торопыгина⁴,
А.П. Козлов^{1,4}, Е.К. Козлова^{1,4}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Физический факультет, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт ядерной физики имени Д.В. Скобельцына Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

Аннотация – Радиация вызывает окислительные процессы, приводящие к изменению молекул тканей, в том числе белка миоглобина. Схожие процессы происходят в результате воздействия ультрафиолетом. При облучении изменяются концентрации различных форм миоглобина: оксимиоглобин окисляется до метмиоглобина, при этом концентрация метмиоглобина зависит от времени воздействия и от срока хранения образцов раствора миоглобина.

Ключевые слова — миоглобин; метмиоглобин, оксимиоглобин, окислительные процессы; ультрафиолетовое излучение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Радиационная обработка биологических объектов, в том числе продуктов питания, позволяет уменьшить количество контаминантов, при этом возможно изменение химического состава, текстуры и функциональных способностей самих объектов [1]. Так, белок миоглобин, содержащийся в скелетных мышцах и мышцах сердца, при нормальном функционировании тканей организма может находиться в одной из трёх форм: оксимиоглобин (оХуМб), дезоксимиоглобин (деоХуМб) и метмиоглобин (метМб) [2]. Наличие метмиоглобина является следствием окисления железа Fe²⁺ в Fe³⁺ и маркером порчи мяса. При воздействии излучением оксимиоглобин окисляется до метмиоглобина за счет активных форм кислорода, возникающих в растворах. Важно подбирать оптимальные диапазоны доз обработки для каждого типа биообъектов, а также требуется разработка методов оценки состояния биообъектов после радиационной обработки.

При воздействии ультрафиолетового излучения образуются активные формы кислорода, схожие с радикалами, образующимися в следствии воздействия ионизирующим излучением. В данной работе в качестве модельного излучения применялся ультрафиолет.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран экстрагированный в раствор 0,9% NaCl из мяса говяжьей вырезки, миоглобин. Экспериментальные образцы растворов облучались на УФ-лампе ООО «Ферропласт Медикал» (Россия, Ярославская область) при длине волны 254 нм в течение 5, 10, 15, 20, 25, 30 минут.

Изменения концентраций производных миоглобина в облученных и необлученных растворах оценивались по спектрам миоглобина, измеренным с помощью спектрофотометра УФ-3000 («ТМ ЭКОВЬЮ», Россия) [3] в диапазоне длин волн от 190 до 1100 нм на 1-е – 8-е сутки после облучения. Обработка спектров была проведена с помощью программы Origin Lab, по которым определены концентрации всех форм миоглобина в каждом растворе [4].

III. РЕЗУЛЬТАТЫ

Было показано, что в необлученных образцах говядины в течение 8 суток хранения концентрация метмиоглобина увеличивалась в следствие окислительных процессов с 11,77% до 40,77%. При облучении ультрафиолетовым излучением и с увеличением времени воздействия концентрация метмиоглобина увеличивалась в растворах миоглобина, облученных в разные дни хранения мяса. С увеличением срока хранения мяса изменялась чувствительность молекул миоглобина к ультрафиолетовому излучению.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Черняев А. П. Радиационные технологии. Наука. Народное хозяйство. Медицина / А.П. Черняев // М: Издательство Московского университета — 2019. — 231 с.
- [2] В. Ф. Антонов, А. М. Черныш, Е. К. Козлова, А. В. Коржув. Физика и биофизика, Москва, 2015.
- [3] <https://istina.msu.ru/equipment/card/615320740/>
- [4] Bliznyuk, Ulyana, et al. Hemoglobin Derivatives in Beef Irradiated with Accelerated Electrons. // *Molecules* 28.15 (2023): 5773;

Пьезополимерные PVDF-TrFE детекторы для сканирующей оптоакустической ангиографии экспериментальных новообразований

А.А. Курников¹, А.Г. Санин¹, А.М. Глявина¹, А.Г. Орлова¹, Г.П. Волков¹, А.В. Ковальчук¹, Д. Рязанский^{2,3}, П.В. Субочев¹

¹Институт прикладной физики имени А.В. Гапонова-Грехова РАН, Нижний Новгород, Россия

²UZH Zurich, Швейцария

³ETH Zurich, Швейцария

Аннотация — оптоакустическая ангиография это неинвазивный метод визуализации, основанный на облучении биологических тканей короткими лазерными импульсами с последующей регистрацией широкополосных ультразвуковых волн. Одним из применений метода является изучение изменений морфологии сосудистой сети в экспериментальной опухоли при ее естественном росте или при использовании различных методов лечения. В данной работе были исследованы возможности сканирующей оптоакустической микроскопии с использованием фокусирующих пьезополимерных детекторов на основе поливинилиденфторид-трифторэтилена (PVDF-TrFE). Чувствительность разработанного PVDF-TrFE детектора достигала 1.2 Па в полосе частот от 0.1 до 30 МГц с угловым охватом 150 градусов. На примере экспериментальных опухолей было показано, что такой подход значительно улучшает качество оптоакустической визуализации, позволяя получать детальные изображения как крупных, так и мельчайших произвольно-ориентированных сосудов.

Ключевые слова — *Оптоакустика; Широкополосные детекторы; Высокая чувствительность; Экспериментальные новообразования.*

I. ВВЕДЕНИЕ

Сосудистые особенности новообразований играют ключевую роль в клинической онкологии, так как они важны для диагностики, прогнозирования и оценки эффективности лечения. Для мониторинга прогрессирования заболеваний и анализа ответов на лечение широко используются доклинические модели, такие как подкожная имплантация опухолевых клеток.

Оптоакустическая ангиография зарекомендовала себя как один из наиболее эффективных методов визуализации кровеносных сосудов без использования меток, включая неоваскулярные сети в опухолевых узлах. Этот метод основан на использовании коротких оптических импульсов и широкополосных ультразвуковых приемников, что позволяет получать высококонтрастные трехмерные изображения сосудистых сетей с высоким разрешением (~50 мкм) на глубине до 2 мм в оптически плотных тканях.

В работе представлена система сканирующей оптоакустической ангиографии с использованием

пьезополимерного PVDF-TrFE детекторы, который благодаря высокой чувствительности и широкому угловому охвату значительно улучшает качество визуализации сосудистой сети экспериментальных новообразований.

II. РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке 1а приведены короткий оптоакустический импульс и его спектр, зарегистрированные PVDF-TrFE детектором от тонкой черной пленки при облучении ее короткими лазерными импульсами на 532 нм. Рисунок 1б - фото сферического детектора, используемого в экспериментах. На рисунке 1в результат сканирующей ОА ангиографии модели опухоли на основе клеточной линии почечно-клеточного рака SN-12С.

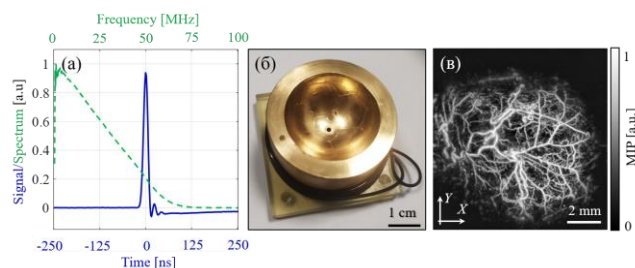


Рис. 1. (а) – Временная и частотная характеристики детектора. (б) – Сферический PVDF-TrFE детектор. (в) – ОА визуализация сосудистой сети экспериментальной опухоли.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Центра компетенций «Центр фотоники» за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, контракт № 075-15-2022-316.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] A. Kurnikov, A. Sanin, X.L.D. Ben, D. Razansky, and P. Subochev, "Ultrawideband sub-pascal sensitivity piezopolymer detectors," *Ultrasonics*, vol. 141, pp. 107349, 2024.
- [2] A. Kurnikov, G. Volkov, A. Orlova, A. Kovalchuk, Y. Khochenkova, D. Razansky, and P. Subochev, "Fisheye piezo polymer detector for scanning optoacoustic angiography of experimental neoplasms," *Photoacoustics*, vol. 31, pp. 100507, 2023

Использование коэффициента затухания для оценки морфологического статуса перитуморального белого вещества при глиомах различной степени злокачественности

Л.С. Кухнина¹, К.А. Ачкасова^{1,2}, Е.Б. Киселева¹, А.Л. Потапов¹, А.А. Моисеев³, Н.Д. Гладкова¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

³Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, Россия

Аннотация — Использование коэффициента затухания позволяет оценить воздействие моделей глиом различной степени злокачественности на перитуморальное белое вещество. Модели агрессивных глиом оказывают выраженное влияние на значение коэффициента затухания за счет инфильтрации тканей опухолевыми клетками, разрушения миелиновых волокон и отека, другие модели опухолей вызывают компрессию миелиновых волокон без их повреждения и выраженной инвазии опухолевых клеток, что сохраняет значения коэффициента затухания неизменными.

Ключевые слова — белое вещество, глиобластома 101/8; астроцитомы 10-17-2; глиома С6; ОКТ; перитуморальная зона

I. ВВЕДЕНИЕ

Радикальное удаление глиом головного мозга с последующей лучевой и химиотерапией является золотым стандартом лечения. Инвазивный характер роста опухоли предполагает не только проведение резекции опухоли, но и удаление перитуморальной зоны, характеризующейся структурными изменениями и инфильтрацией опухолевыми клетками. Известно, что глиомы часто развиваются в белом веществе головного мозга. Таким образом, оценка состояния перитуморального белого вещества играет важную роль для уточнения границ резекции опухоли. В последнее время разрабатываются технологии, позволяющие провести прижизненную оценку состояния белого вещества, среди которых можно выделить оптическую когерентную томографию.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на *ex vivo* образцах головного мозга крыс. В исследование было включено 16 животных, разделенные на 4 группы: крысы с глиобластомой 101/8 (n=5), астроцитомой 10-17-2 (n=5), с глиомой С6 (n=3), контрольная группа (n=3). Опухолевые клетки прививались в область мозолистого тела правого полушария мозга. При достижении опухоли размера,

достаточного для ОКТ исследования, животные выводились из эксперимента с последующим проведением ОКТ сканирования фронтальных срезов головного мозга. Количественная обработка массивов ОКТ данных проводилась путем расчета коэффициента затухания. На основании полученных данных были построены цветокодированные карты коэффициента затухания для каждого массива ОКТ данных. По окончании образцы были направлены на гистологическое исследование, а также на иммуногистохимическое исследование с использованием антител к основному белку миелина для оценки состояния миелиновых волокон.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ

Все опухоли располагались в правом полушарии в области мозолистого тела. Развитие глиобластомы 101/8 характеризовалось выраженной инфильтрацией в окружающие ткани, развитием отека и деструкция миелиновых волокон. Данные изменения сопровождались выраженным снижением коэффициента затухания по сравнению с контрольной группой. Для астроцитомы 10-17-2 характерны деструкция миелиновых волокон, инфильтрация белого вещества опухолевыми клетками, отек различной степени выраженности. В данной группе также было отмечено значимое снижение значений коэффициента затухания в области мозолистого тела. Для модели глиомы С6 характерна незначительная инвазия в окружающие ткани, что отличает ее от 10-17-2 и 101/8. Было выявлено смещение мозолистого тела и компрессия миелиновых волокон, при этом значения коэффициента затухания не имели значимых различий с контрольной группой.

Таким образом различные модели глиальных опухолей оказывают разное влияние на значения коэффициента затухания белого вещества, что связано с возникающими морфологическими изменениями.

Прямое измерение времен жизни фосфоресценции синглетного кислорода с использованием сверхпроводникового однофотонного детектора

П.В. Морозов^{2,3}, В.С. Андреев^{1,2,3}, В.И. Щеславский⁴, В. Бекер⁵, Г.Н. Гольцман^{1,2}

¹Высшая школа экономики, НИУ ВШЭ, Москва, Россия

²Московский Педагогический Государственный Университет, МПГУ, Москва, Россия

³Сверхпроводниковые нанотехнологии, ООО «Сконтел», Москва, Россия

⁴Приволжский Исследовательский Медицинский Университет, ПИМУ, Нижний Новгород, Россия

⁵Becker & Hickl GmbH, Берлин, Германия

Аннотация — В этой работе мы демонстрируем прямое детектирование люминесценции синглетного кислорода в различных растворах с помощью сверхпроводникового однофотонного детектора. В том числе были использованы методы для определения и подтверждения того, что детектируемые фотоны имеют длину волны 1270 нм. Добавление азид натрия и SOGS в раствор с фотосенсибилизатором приводило к уменьшению генерации, что было наглядно продемонстрировано.

Ключевые слова — сверхпроводниковые детекторы, липофуциновые гранулы, FLIM

I. ВВЕДЕНИЕ

Молекулярный кислород имеет уникальную электронную структуру: основное состояние кислорода - триплетное состояние $3O_2$, а возбужденное - синглетное состояние $1O_2$.

Генерация фосфоресценции синглетного кислорода происходит только при возбуждении фотосенсибилизатора (Methylene Blue, Chlorin E6, Rosa Bengal и т.д.). Переход кислорода из синглетного состояния в триплетное приводит к возникновению микросекундной фосфоресценции на длине волны около 1270 нм. Кинетика образования и распада синглетного кислорода в гомогенной системе была рассмотрена и описана А.А. Красновским и соавторами [1].

Низкая вероятность электронного перехода от $1O_2$ к $3O_2$, слабая эффективность излучения фосфоресценции - 10^{-6} в водных средах, все это требует очень чувствительных детекторов ближнего инфракрасного диапазона. В этой работе мы использовали сверхпроводящий однофотонный детектор (SSPD), который обладает широкополосным спектральным диапазоном от УФ до БИК и эффективностью системы более 90% при длине волны 1270 нм и низкой (100 cps) скорости темнового счета. Это лучшее решение для

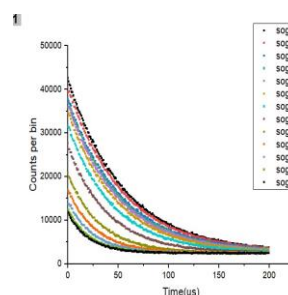


Рис. 1 .Время жизни синглетного кислорода в ацетоне с фотосенсибилизатором Chlorin E6 с добавлением SOGS

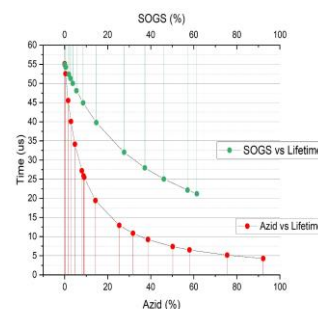


Рис. 2 Время жизни синглетного кислорода с добавлением SOGS и Азида Натрия.

обнаружения прямой фосфоресценции синглетного кислорода.

II. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Детектирование одиночных фотонов на длине волны 1270 нм позволяет осуществлять прямой мониторинг синглетного кислорода ($1O_2$), что делает обнаружение люминесценции синглетного кислорода (SOLD) мощным дозиметрическим методом для фотодинамической терапии при лечении рака или для других медицинских применений.

В этой работе мы показываем, что сверхпроводниковыми однофотонными детекторами можно регистрировать как флуоресценцию клеток (фотосенсибилизаторов или эндогенных флуорофоров), так и фосфоресценцию синглетного кислорода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] AA Krasnovsky Jr. Photochemistry and Photobiology 29 (1), 29-36 (1979).

Спектроскопическое исследование культуры клеток HeLa

А.А. Мосунов¹, П.А. Мутовкин¹, И.И. Ращенко¹

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Севастопольский государственный университет", ФГАОУ ВО СевГУ, Севастополь, Россия

Аннотация – в работе рассмотрен вопрос картирования клеток культуры HeLa методом спектроскопии комбинационного рассеяния.

Ключевые слова — онкологическая клеточная линия; антиопухолевые антибиотики; фуллерен C₆₀; адресная доставка лекарственного препарата

I. ВВЕДЕНИЕ

Согласно информации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) неинфекционные заболевания (включая рак) являются причиной 74% всех смертей в мире в 2019 году и этот показатель только вырос по сравнению с 61% в 2000 году. При этом вклад в эти цифры различных онкологических заболеваний (16%) стоит на втором месте после проблем с сердечно-сосудистой системой (27%) [1].

В настоящее время существует множество методик терапии онкологических заболеваний [2]. Одним из классических подходов является химиотерапия, которая наряду с множеством положительных моментов характеризуется сравнительно большим процентом побочных эффектов. Одним из современных способов их преодоления является использование адресной доставки лекарственных препаратов к целевому органу или ткани [2-4].

Данная работа является первым этапом исследования процесса совместного введения в клеточную культуру HeLa антиопухолевых антибиотиков и фуллерена C₆₀ в качестве молекулы-доставщика.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток HeLa эндотелия матки Генриетты Лакс (Henrietta Lacks). Поддержание роста клеточной культуры производилось с помощью полной питательной среды: 44 мл DMEM (содержит высокую концентрацию витаминов аминокислот, глюкозы), 5 мл эмбриональной телячьей сыворотки, 0,5 мл ПВК + пенициллин-стрептомицин.

Для проведения анализа, культура, содержащая клетки наносилась на эпитаксиальную структуру кремния. После 24 часов экспозиции препарата, подложка, содержащая клетки, промывалась фосфатно-солевым буфером DPBS, затем клетки фиксировались 20%-ым раствором формальдегида.

Для анализа состояния клеток мы применили метод спектроскопии комбинационного рассеяния. Исследования проводились на сканирующем зондовом микроскопе Ntegra Spectra, объединенном с рамановским спектрометром.

Параметры регистрации отклика от культуры были следующими: лазеры с возбуждающей длиной волны 473, 532 и 633 нм, для разрешения спектра использовалась дифракционная решетка 1200 штрихов/мм, область сканирования: 100*100 мкм.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время нами были получены первые изображения рамановского отклика культуры клеток HeLa на подложке, после ее фиксации формалином. Для продолжения работы нам необходимо подобрать оптимальный метод пробоподготовки и фиксации клеток на поверхности, а также параметры сканирования для достижения максимально детального и информативного изображения клетки с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния. После решения этой задачи мы перейдем к введению в культуру клеток антиопухолевых антибиотиков, а также их комплексов с потенциальными системами доставки (фуллерен, наноплазмы).

Регистрация распределения указанных комплексов по культуре клеток позволит сделать определенные выводы об эффективности той или иной комбинации препаратов в качестве системы адресной доставки лекарственных средств.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена за счет средств госзадания FEFM-2023-0005.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- [2] J. Zugazagoitia, C. Guedes, S. Ponce, I. Ferrer, S. Molina-Pinelo, L. Paz-Ares, Current Challenges in Cancer Treatment, Clinical Therapeutics, Volume 38, Issue 7, 2016, Pages 1551-1566
- [3] J. Baranwal, B. Barse, A. Di Petrillo, G. Gatto, L. Pilia, A. Kumar Nanoparticles in Cancer Diagnosis and Treatment. Materials 2023, 16, 5354.
- [4] K. Elumalai, S. Srinivasan, A. Shanmugam, Review of the efficacy of nanoparticle-based drug delivery systems for cancer treatment, Biomedical Technology, Volume 5, 2024, Pages 109-122

Флуоресцентная наноскопия: от детектирования одиночных молекул к биомедицине и квантовым технологиям

А.В. Наумов¹⁻³

¹ Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Троицкое обособленное подразделение (ТОП ФИАН), Москва, Троицк, Россия

² Московский Педагогический Государственный Университет (МПГУ), Москва, Россия

³ Институт спектроскопии РАН, Москва, Троицк, Россия

В лекции представлены достижения и перспективы фотоники одиночных молекул и, в целом, квантовых излучателей различной природы (молекулярных комплексов, полупроводниковых коллоидных квантовых точек, центров окраски в алмазе). Обсуждается история развития этой области науки, методы флуоресцентной спектроскопии и наноскопии в широком диапазоне температур, их разнообразные междисциплинарные приложения в области диагностики и сенсорики, перспективы развития этого направления, в том числе, в области биомедицины.

Ключевые слова: люминесценция; молекула; квантовая точка; центр окраски; алмаз; наночастица; наноскопия; комбинационное рассеяние света; ГКРС; SERS; диагностика; сенсорики; маркер; квантовые технологии; биомедицина

I. ВВЕДЕНИЕ

Встречая 35-летний юбилей, спектроскопия одиночных молекул демонстрирует как выдающиеся достижения (уже отмеченные Нобелевскими премиями [1,2]), так и беспрецедентный потенциал дальнейшего развития по широкому кругу фундаментальных задач и приложений в физической химии, материаловедении, квантовых технологиях, биомедицине. [3]

II. СОДЕРЖАНИЕ

Спектроскопия и флуоресцентная микроскопия одиночных молекул (в общем случае, наночастиц – излучателей различной природы и химического состава) стала мощным инструментом исследования структуры и внутренней динамики материалов и нанообъектов, прояснения микроскопической природы внутри- и межмолекулярных процессов, взаимодействия вещества с электромагнитным излучением. Разработанные методики и инструменты предоставляют широкий спектр возможностей: абсорбционная и люминесцентная спектроскопия, комбинационное рассеяние света (КРС), кинетика люминесценции и коррелированный счет фотонов, конфокальная и широкопольная флуоресцентная микроскопия, а также методики комбинированной диагностики с использованием методов ближнепольной, атомно-силовой и электронной микроскопии. [4] При этом, измерения могут проводиться в различных условиях, в широком диапазоне температур от комнатной (что представляет наибольший интерес для биомедицинских приложений) и вплоть до криогенных, где возможно детектирование бесфоновых спектральных линий,

экстремально чувствительных к параметрам ближайшего окружения. [5]

Прорывной технологий стала флуоресцентная наноскопия, где регистрация люминесцентных изображений одиночных квантовых излучателей – маркеров позволяет определить их пространственные координаты с нм точностью путем анализа аппаратной функции точечного источника (PSF). Таким образом, удается реконструировать структуру маркированного объекта с субдифракционным разрешением. Модификация PSF методами адаптивной оптики позволяет восстановить все 3 координаты излучателей, т.е. реализовать технику 3D-наноскопии как для диагностики объемных материалов, так и для трекинга отдельных наночастиц (например, в микрофлюидных технологиях). [6]

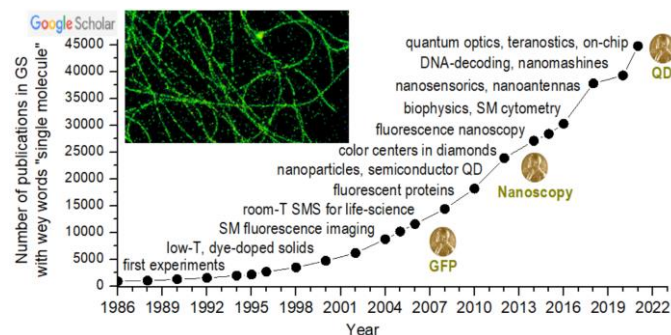
Наноскопия, совмещенная с регистрацией спектров отдельных молекул, позволяет осуществлять «спектральную нанотомографию», отражающую особенности локальной структуры и динамики образца. [7] Так, может быть реализована микроскопия визуализации времен жизни люминесценции одиночных молекул со сверхвысоким пространственным разрешением (superresolution FLIM) – основа техники микрорефрактометрии. [8]

Новый импульс в развитии наноскопия приобрела с появлением новых искусственных люминофоров – полупроводниковых коллоидных квантовых точек (КТ) [9-12], а также алмазов с центрами окраски. [13, 14] Одиночные КТ проявляют эффект мерцания люминесценции, связанный с внутренней Оже-ионизацией и туннельными переходами атомов нанокристалла, что, в свою очередь, связано с наличием дефектов в структуре, на поверхности и интерфейсах оболочечного нанокристалла. Внутренняя динамика КТ приводит также к наличию эффектов спектральной диффузии. Центры окраски в алмазе, проявляющие уникальные спектрально-люминесцентные свойства, открывают путь к прикладному использованию их в квантовых технологиях, медицинской и биофизике, наносенсорике. Так, например, реализованы методы внутриклеточной термометрии. [15]

Отдельное место в технологиях фотоники одиночных молекул занимает возможность регистрации спектров комбинационного рассеяния света (Рамановская спектроскопия). Здесь методы гигантского усиления КРС с

использованием коллоидных растворов наночастиц или усиливающих метаповерхностей открывают возможность спектрального анализа на уровне отдельных (биомиметических) молекул, единичных биологических нанообъектов. [16-18]

В биомедицине фотоника одиночных молекул и наночастиц находит применение как при решении классических задач на новом уровне, так и при достижении принципиально новых горизонтов: визуализация, аналитика и сенсорика, микрофлюидика, клеточные технологии, вирусология, генетика и технологии секвенирования ДНК, фотодинамические технологии, тераностика. [19]



III. БЛАГОДАРНОСТИ

Лектор благодарит коллег и соавторов, вместе с которыми получены результаты, представленные в докладе (подробнее с работами можно ознакомиться на сайте www.single-molecule.ru).

IV. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] W. E. Moerner "I love science in many forms"// *Laboratory and production* 11, 8 (2020). <10.32757/2619-0923.2020.1.11.8.16>
- [2] A.V. Naumov, V.V. Utochnikova "Achievements and perspectives of luminescence at the All-Russian conference with international participation LUMOS-2024"// *PHOTONICS Russia* 18, 224 (2024). <10.22184/1993-7296.FRos.2024.18.3.224.228>
- [3] F. Cichos, T. Xia, H. Yang, P. Zijlstra "The ever-expanding optics of single-molecules and nanoparticles"// *The Journal of Chemical Physics* 161 (2024). <10.1063/5.0221680>
- [4] I. Y. Eremchev, M. Y. Eremchev, A. V. Naumov "Multifunctional far-field luminescence nanoscope for studying single molecules and quantum dots"// *Phys. Usp.* 62, 294 (2019). <10.3367/UFNe.2018.06.038461>
- [5] A. V. Naumov "Low-temperature spectroscopy of organic molecules in solid matrices: from the Shpol'skii effect to laser luminescent spectromicroscopy for all effectively emitting single molecules"// *Phys. Usp.* 56, 605 (2013). <10.3367/UFNe.0183.201306f.0633>
- [6] I. Y. Eremchev, D. V. Prokopova, N. N. Losevskii, I. T. Mynzhasarov, S. P. Kotova, A. V. Naumov "Three-dimensional fluorescence nanoscopy of single quantum emitters based on the optics of spiral light beams"// *Phys. Usp.* 65, 617 (2021). <10.3367/UFNe.2021.05.038982>
- [7] A. V. Naumov, A. A. Gorshelev, Y. G. Vainer, L. Kador, J. Kohler "Far-Field Nanodiagnosics of Solids with Visible Light by Spectrally Selective

- Imaging"// *Angew. Chem.-Int. Edit.* 48, 9747 (2009). <10.1002/anie.200905101>
- [8] A. V. Naumov, A. A. Gorshelev, M. G. Gladush, T. A. Anikushina, A. V. Golovanova, J. Köhler, L. Kador "Micro-Refractometry and Local-Field Mapping with Single Molecules"// *Nano Lett.* 18, 6129 (2018). <10.1021/acs.nanolett.8b01753>
- [9] A. I. Arzhanov, A. O. Savostianov, K. A. Magaryan, K. R. Karimullin, A. V. Naumov "Photonics of Semiconductor Quantum Dots: Basic Aspects"// *PHOTONICS Russia* 15, 622 (2021). <10.22184/1993-7296.FRos.2021.15.8.622.641>
- [10] A. I. Arzhanov, A. O. Savostianov, K. A. Magaryan, K. R. Karimullin, A. V. Naumov "Photonics of Semiconductor Quantum Dots: Applied Aspects"// *PHOTONICS Russia* 16, 96 (2022). <10.22184/1993-7296.FRos.2022.16.2.96.112>
- [11] E. A. Podshivaylov, M. A. Kniazeva, A. O. Tarasevich, I. Y. Eremchev, A. V. Naumov, P. A. Frantsuzov "A quantitative model of multi-scale single quantum dot blinking"// *J Mater Chem C* 11, 8570 (2023). <10.1039/d3tc00638g>
- [12] A. A. Rempel, O. V. Ovchinnikov, I. A. Weinstein, S. V. Rempel, Y. V. Kuznetsova, A. V. Naumov, M. S. Smirnov, I. Y. Eremchev, A. S. Vokhmintsev, S. S. Savchenko "Quantum dots: modern methods of synthesis and optical properties"// *Russian Chemical Reviews* 93 (2024). <10.59761/rcr5114>
- [13] I. Y. Eremchev, A. Y. Neliubov, K. N. Boldyrev, V. G. Ralchenko, V. S. Sedov, L. Kador, A. V. Naumov "Microscopic Insight into the Inhomogeneous Broadening of Zero-Phonon Lines of GeV- Color Centers in Chemical Vapor Deposition Diamond Films Synthesized from Gaseous Germane"// *The Journal of Physical Chemistry C* 125, 17774 (2021). <10.1021/acs.jpcc.1c02617>
- [14] A. Y. Neliubov, I. Y. Eremchev, V. P. Drachev, S. S. Kosolobov, E. A. Ekimov, A. I. Arzhanov, A. O. Tarasevich, A. V. Naumov "Enigmatic color centers in microdiamonds with bright, stable, and narrow-band fluorescence"// *Phys. Rev. B* 107 (2023). <10.1103/PhysRevB.107.L081406>
- [15] M. Suzuki, T. Plakhotnik "The challenge of intracellular temperature"// *Biophysical Reviews* 12, 593 (2020). <10.1007/s12551-020-00683-8>
- [16] E. P. Kozhina, S. A. Bedin, N. L. Nechaeva, S. N. Podoyntsyn, V. P. Tarakanov, S. N. Andreev, Y. V. Grigoriev, A. V. Naumov "Ag-nanowire bundles with gap hot spots synthesized in track-etched membranes as effective sers-substrates"// *Appl. Sci.* 11, 1 (2021). <10.3390/app11041375>
- [17] E. Kozhina, S. Bedin, A. Martynov, S. Andreev, A. Piryazev, Y. Grigoriev, Y. Gorbunova, A. Naumov "Ultrasensitive Optical Fingerprinting of Biorelevant Molecules by Means of SERS-Mapping on Nanostructured Metasurfaces"// *Biosensors* 13 (2022). <10.3390/bios13010046>
- [18] N. P. Kovalets, E. P. Kozhina, I. V. Razumovskaya, S. A. Bedin, A. A. Piryazev, Y. V. Grigoriev, A. V. Naumov "Toward single-molecule surface-enhanced Raman scattering with novel type of metasurfaces synthesized by crack-stretching of metallized track-etched membranes"// *The Journal of Chemical Physics* 156 (2022). <10.1063/5.0078451>
- [19] S. Shashkova, Mark C. Leake "Single-molecule fluorescence microscopy review: shedding new light on old problems"// *Biosci. Rep.* 37 (2017). <10.1042/bsr20170031>

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства просвещения РФ «Физика наноструктурированных материалов и высокочувствительная сенсорика: синтез, фундаментальные исследования и приложения в фотонике, науках о жизни, квантовых и нанотехнологиях» (МПГУ, тема № 124031100005-5).

Новые оптические методы исследований *in vitro* и *in vivo* на основе инновационных приборов российского производства

М.П. Никитин^{1,2,3}, Е.С. Коренков¹, А.В. Литвиненко¹, М.А. Юрченко¹, Д.А. Маэди¹, В.В. Леванович¹, А.В. Пушкарев^{1,3}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), МФТИ, Москва, Россия

²Научно-технологический университет Сириус, НТУ Сириус, Сириус, Россия

³ООО «Абисенс», Сириус, Россия

Аннотация – В данной работе предложен ряд новых оптических методов исследований с использованием инновационных отечественных научных приборов для изучения межмолекулярных биомолекул, биовизуализации в оптическом и ИК-диапазоне, синтеза наночастиц, а также измерения их распределения по размерам.

Ключевые слова: биовизуализация, SWIR, наночастицы

I. ВВЕДЕНИЕ

Оптические измерения давно стали базовым инструментом в области биологии как с точки зрения разнообразия и объема получаемых данных, так и с точки зрения скорости и удобства проведения измерений. В последнее время стало возможным существенно расширить возможности в области оптических методов за счет построения новых функциональных устройств, которые позволяют производить ранее недоступные исследования, либо позволяют кардинально ускорить измерения. В данной работе предложен ряд подобных методов с использованием последних достижений отечественного научного приборостроения.

II. БИОВИЗУАЛИЗАЦИЯ

Использование флуоресцентных и люминесцентных меток позволяет изучать различные биологические процессы *in vivo*. В работе показано, как с помощью оптического томографа LumoTrace (Abisense, Россия) с отечественным проприетарным высокочувствительным iCCD-детектором, способным детектировать единичные фотоны, удастся регистрировать автобиолюминесценцию мышей (без введения субстратов и люцифераз), а также проводить измерения флуоресценции с разрешением по времени. Кроме того, возможность использования в том же приборе SWIR-камеры (short-wavelength infrared) позволяет визуализировать различные репортеры в SWIR-диапазона (1000-2000 нм). Комбинация нескольких биовизуализирующих модальностей дает более полную картину поведения различных флуоресцентных и/или биолюминесцентных объектов *in vivo*.

III. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОЛЕКУЛ

Недавно обнаруженный феномен молекулярной коммутации¹ (новый механизм хранения и обработки информации в биомолекулах, в т.ч. ДНК/РНК, основанный на низкоаффинных взаимодействиях некомплементарных молекул) открывает много новых возможностей для снижения побочных эффектов генотерапевтических препаратов, исследования в области нейротехнологий, онкотерапии и др. Однако, для продвижения в данных областях требуется создание существенно более точных систем предсказания аффинностей биомолекул, чем доступны сегодня. В рамках данной работы мы показываем, как использование системы оптической визуализации LumoTrace (Abisense, Россия) позволяет проводить высокопроизводительные измерения аффинностей молекул, а также различных кинетических измерений биомолекулярных реакций с точным контролем/анализом температуры реакций, недоступным современным планшетным ридерам.

IV. СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ НАНОЧАСТИЦ

Кроме того, в данной работе был разработан ряд репортерных наноагентов с помощью системы производства РНК-вакцин (Abisense, Россия), которая отличается возможностью настройки параметров чипа для генерации. Для характеристики этих и других наночастиц был использован анализатор AstraTrace, способный определять их размер по броуновскому движению.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активное развитие российского приборостроения привнесло новые возможности для проведения исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Nikitin, M. P. Non-complementary strand commutation as a fundamental alternative for information processing by DNA and gene regulation. *Nat Chem* 15, 70–82 (2023).

Различные части данной работы выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение 075-03-2024-117, проект FSMG-2022-0016 и проект FSMG-2023-0017.

Фотолюминесцентная микроскопия и комбинационное рассеяние света для анализа наноконтейнеров на основе пористого кремния в биологических системах

Л.А. Осминкина^{1,2}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Физический факультет, Москва, Россия

² Институт Биологического приборостроения РАН, Пушкино, Россия

В представленном цикле работ с использованием методов спектроскопии комбинационного рассеяния света и фотолюминесцентной микроскопии исследовалось взаимодействие наноконтейнеров на основе наночастиц пористого кремния (пКНЧ), загруженных различными противораковыми препаратами, с живыми клетками.

Ключевые слова — фотолюминесцентная микроскопия; комбинационное рассеяние света; пористый кремний; наноконтейнеры; биомедицина

I. ВВЕДЕНИЕ

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) в настоящее время стала мощным и хорошо подходящим неинвазивным и неразрушающим инструментом в биоаналитике. Метод КР основан на обнаружении молекулярных колебаний или вибрационных мод в твердых телах, которые активируются лазерным излучением. По сути, спектры КР являются химическими отпечатками веществ и молекул, и позволяют проводить их диагностику, в том числе и при взаимодействии с живыми клетками.

II. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор пКНЧ в качестве наноконтейнеров для доставки лекарств связан с их доказанными уникальными свойствами, такими как биосовместимость, биodeградируемость, высокая эффективность загрузки для доставки препаратов, перестраиваемые размеры пор, и возможность функционализации поверхности наночастиц для осуществления направленной доставки [1-4].

Показано, что пКНЧ состоят из мелких нанокристаллов кремния (нк-Si) и пор. Фотолюминесцентные (ФЛ) свойства пКНЧ обусловлены квантово-размерными эффектами (КРЭ), возникающими в нк-Si с размерами 2-6 нм. Уменьшение размеров нк-Si сопровождается сдвигом максимума их ФЛ с коротковолновую область спектра. При этом также наблюдается низкочастотный сдвиг максимума КР [1,2].

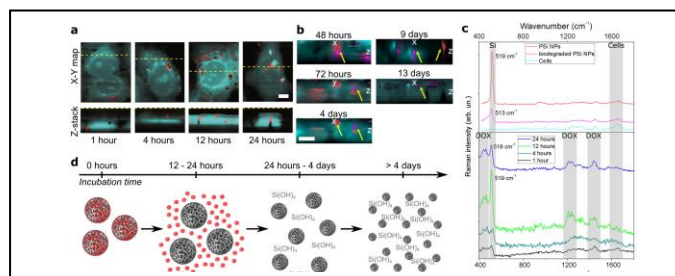


Рис. 1. Изучение доставки доксорубина и биodeградации наночастиц пористого кремния в раковых клетках методом КР [3].

Показано, что наличие ФЛ свойств наночастиц позволяет их использовать для диагностики клеток. Вместе с тем, микроспектроскопия КР предоставляет возможность не только обнаружить поглощение и распределение пКНЧ, локализацию доставляемых ими препаратов (сунитиниб, доксорубин), но и детально исследовать процессы биodeградации наночастиц непосредственно внутри живых клеток [3,4].

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-15-00137, <https://rscf.ru/project/24-15-00137/>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] G. Eason, B. Noble, and I.N. Sneddon, "On certain integrals of Lipschitz-Hankel type involving products of Bessel functions," Phil. Trans. Roy. Soc. London, vol. A247, pp. 529-551, April 1955. (style: references)
- [2] J. Clerk Maxwell, A Treatise on Electricity and Magnetism, 3rd ed., vol. 2. Oxford: Clarendon, 1892, pp.68-73.
- [3] Gongalsky M. B. et al. Semiconductors, vol. 55, 2021, pp. 61-65.
- [4] 2. Gongalsky M. B. et al. Faraday Discussions, vol. 222, 2020, pp. 318-331.
- [5] Maximchik P. V. et al. ACS Biomat Sci & Eng., vol. 5. 2019, pp. 6063-6071.
- [6] Tolstik E. et al. Frontiers in Pharmacology. vol. 13, 2022, p. 962763.

Многоклассовая классификация микроорганизмов с использованием данных оптического отклика

О.О. Павлов, Б.П. Якимов, Д.Д. Лысухин, Е.А. Ширшин

¹Физический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

Аннотация — в настоящем исследовании была изучена возможность применения данных оптического отклика колоний микроорганизмов для их идентификации с применением современных методов машинного обучения.

Ключевые слова — микробиология, флуоресцентная спектроскопия, машинное обучение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Для назначения корректного диагноза пациенту в клинической практике традиционно производится отбор пробы биологического материала, используемого в дальнейшем для идентификации микроорганизма, являющегося потенциальным возбудителем заболевания. Чем быстрее будет произведено распознавание, тем раньше пациенту будет назначена соответствующая антибактериальная терапия и тем раньше наступит его успешное выздоровление. Представителем классических методов идентификации микроорганизмов, зарекомендовавшим себя в клинической практике, выступает метод биохимического анализа, однако он является крайне трудо- и времязатратным из-за необходимости последовательного анализа взаимодействия материала пробы с реагентами. Примером более современного метода, доступного для более крупных микробиологических лабораторий, может выступать метод масс-спектрометрии [1], однако при использовании подобных методов необходима предварительная подготовка выращенной в питательной среде

биологической пробы перед распознаванием, увеличивающая время, затрачиваемое на идентификацию.

II. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

В качестве примера метода идентификации микроорганизмов, не требовательного к предварительной подготовке культивированного биоматериала пробы, могут выступать подходы, использующие данные оптического отклика колоний микроорганизмов.

В ходе выполнения работы были оценены точности классификации при использовании оптических методов для классификации некоторых микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Hou, T. Y., Chiang-Ni, C., & Teng, S. H. "Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology," *Journal of food and drug analysis*, vol. 27 no.2, pp. 404-414, 2019.

Визуализация Mitotracker Orange СМТМRos при помощи FLIM для оценки состояния митохондрий

Е.В. Панферов¹, И.М. Спивак², Н.И. Тапильская³, Р.И. Глушаков²

¹Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

²Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

³ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

В данной работе рассматривается совместное использование конфокальной микроскопии и FLIM-микроскопии для анализа физиологического состояния митохондрий. Показано, что увеличение времени затухания флуоресценции митохондриального красителя Mitotracker Orange СМТМRos, вызванное его окислением, сопровождается разделением и укорочением митохондрий.

Митохондрии; FLIM; АФК; клетки кумулюса

I. ВВЕДЕНИЕ

Белковые комплексы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий в ходе работы иногда образуют активные формы кислорода (АФК). В ряде патологических состояний избыточное образование АФК нарушает работу митохондрий, что может приводить к гибели всей клетки [1]. Экспериментальная оценка активности АФК в клетке при помощи чувствительных к ним флуоресцентных красителей сопряжена с рядом методологических трудностей, связанных с легкостью окисления их атмосферным кислородом. Однако, для потенциал-зависимого митохондриального красителя Mitotracker Orange СМТМRos (МТО) ранее было показано, что при окислении АФК у него возрастает время нахождения в возбужденном состоянии, т, что косвенно позволяет отслеживать присутствие АФК в митохондриях при помощи FLIM-микроскопии [2].

Целью нашей работы стала разработка алгоритма визуализации и анализа препаратов клеточных культур, совмещающего FLIM-микроскопию с методами морфометрического анализа, для максимально эффективного получения данных при работе с редким клиническим материалом.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были исследованы отделенные от ооцита клетки кумулюса 17 пациенток возрастом от 44 до 20 лет, проходящих репродуктивную терапию на базе клиники ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О.Отта". Клетки культивировали в течение дня после выделения, затем окрашивали при помощи МТО и фиксировали. С препаратов получали трехмерные конфокальные микрофотографии, над которыми затем проводили операцию деконволюции в программе Huygens Professional. Морфометрические параметры были получены в программе Bitplane Imaris с использованием модуля Filament Tracer. FLIM микроскопия

выполнялась при помощи системы Leica SMD FLCS, кривая затухания принималась за моноэкспонентную.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Корреляционный анализ по методу Пирсона показал, что величина τ МТО имеет слабую прямую корреляцию с числом отдельных митохондрий ($R = 0.48, p = 0.053$). Число отдельных митохондрий в свою очередь демонстрирует слабую отрицательную корреляцию с их линейным размером ($R = -0.45, p = 0.069$). Такой эффект можно связать с механизмом контроля качества митохондрий - по-видимому, с увеличением генерации АФК, всё больше компонентов ЭТЦ оказываются повреждены ими, что приводит к изоляции митохондрий с поврежденными комплексами ЭТЦ в результате модификации активности аппарата деления митохондрий [3]. Мы предполагаем, что сравнительно низкие значения статистической значимости ($p < 0.1$) могут быть связаны с недостаточно большим объемом исследованной выборки.

Таким образом, мы считаем, что совместное использование FLIM и морфометрического анализа позволяет при минимальных затратах на пробоподготовку получить широкий спектр информации о проходящих в митохондриях клеток кумулюса патологических процессах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование проведено с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Авторы выражают благодарность сотрудникам ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О.Отта" за предоставление клинического материала для работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] J. Nunnari and A. Suomalainen, "Mitochondria: In sickness and in health," *Cell*, vol. 148, no. 6, pp. 1145–1159, 2012
- [2] S. Tomkova, M. Misuth, L. Lenkavska, P. Miskovsky, and V. Hontosova, "In vitro identification of mitochondrial oxidative stress production by time-resolved fluorescence imaging of glioma cells," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1865, no. 4, pp. 616–628, 2018
- [3] C. Cid-Castro, D. R. Hernández-Espinosa, and J. Morán, "ROS as Regulators of Mitochondrial Dynamics in Neurons," *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 38, no. 5, pp. 995–1007, 2018

Мультимодальная ОКТ-диагностика патологий тела матки

А.А. Плеханов¹, М.М. Логинова¹, Е.А. Аветисян², А.А. Шепелева², А.А. Советский³, А.А. Моисеев³, М.М. Карабут¹, С.В. Гамаюнов², Г.В. Геликонов³, Г.О. Гречканев¹, М.А. Сироткина¹, В.Ю. Зайцев³, Н.Д. Гладкова¹

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, ПИМУ, Нижний Новгород, Россия

² Нижегородский областной клинический онкологический диспансер, НОКОД, Нижний Новгород, Россия

³ Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-Грехова РАН, ИПФ РАН, Нижний Новгород, Россия

Патологии тела матки широко распространены и приводят к тяжелым последствиям – от нарушения репродуктивной функции женщины до онкологической нагрузки [1]. Тем не менее большинство из них имеют благоприятный прогноз с возможностью сохранения репродуктивной функции при проведении своевременной первичной диагностики и лечения на ранней стадии заболевания. Наиболее клинически значимые патологии тела матки связаны с изменениями эндометрия [2]. Общепринятая и надежная диагностика патологий эндометрия предполагает высокотравматичные процедуры сбора материала (пайпель-биопсию / раздельное диагностическое выскабливание матки) для проведения гистологического исследования. В последнее время биопсию эндометрия под контролем гистероскопии все чаще выбирают для снижения травматичности и повышения точности диагностики патологий. Однако нередко неоднозначность визуальной гистероскопической оценки и неверный выбор подозрительного участка эндометрия для последующего гистологического исследования приводят к ложному диагнозу и недооценке рака эндометрия [3]. Поэтому существует потребность в новом диагностическом инструменте высокоточной и малоинвазивной морфологической оценки ткани эндометрия.

Наше исследование направлено на выявление возможностей мультимодальной оптической когерентной томографии (ММ ОКТ) в диагностике патологий тела матки. Недавние пилотные исследования коллег продемонстрировали высокие перспективы выявления патологий эндометрия с помощью структурной ОКТ [4,5]. Наши исследования направлены на определение возможности дифференциации морфологических структур тела матки в норме (эндометрий и миометрий) и при патологии (гиперплазия эндометрия, аденомиоз и рак) путем изучения поляризационных (кросс-поляризационная ОКТ [6]) и эластических (компрессионная ОКТ-эластография [7]) свойств тканей. Кросс-поляризационная ОКТ-визуализация образцов ткани матки *ex vivo* позволила дифференцировать нормальный эндометрий от миометрия и идентифицировать очаги аденомиоза путем расчета коэффициента затухания сигнала по глубине. Компрессионная ОКТ-эластография позволила дифференцировать участки гиперплазии и рака эндометрия

по уменьшению и увеличению абсолютных значений модуля упругости, соответственно [8]. Полученные результаты свидетельствуют о возможности выявления патологий эндометрия с помощью ММ ОКТ и актуальности дальнейшего развития технологии для нетравмирующей диагностики и мониторинга эффективности лечения заболеваний тела матки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00405, <https://rscf.ru/project/23-25-00405/>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] R.L. Siegel, K.D. Miller, N.S. Wagle, A. Jemal, "Cancer statistics, 2023," *CA Cancer J. Clin.*, vol. 73(1), pp. 17–48, 2023.
- [2] A.R. Murphy, H. Campo, J.J. Kim, "Strategies for modelling endometrial diseases," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 18(12), pp. 727-743, 2022.
- [3] G. Garuti, P.F. Sagrada, A. Frigoli, O. Fornaciari, A. Finco, M. Mirra, and M. Soligo, "Hysteroscopic biopsy compared with endometrial curettage to assess the preoperative rate of atypical hyperplasia underestimating endometrial carcinoma," *Arch. Gynecol. Obstet.*, vol. 308(3), pp. 971–979, 2023.
- [4] T.S.M. Law, F. Wu, H. Xu, C.C. Wang, and T.C. Li, "Endometrium imaging using real-time rotational optical coherence tomography imaging system: A pilot, prospective and ex-vivo study," *Medicine*, vol. 98(44), p. e17738, 2019.
- [5] B. Ding, T. Jinyuan, K. Tao, Z. Ding, and S. Yang, "A pilot and ex-vivo study of examination of endometrium tissue by catheter based optical coherence tomography," *BMC Med. Imaging*, vol. 22(1), p. 162, 2022.
- [6] K.S. Yashin, E.B. Kiseleva, E.V. Gubarkova, A.A. Moiseev, S.S. Kuznetsov, P.A. Shilyagin, G.V. Gelikonov, I.A. Medyanik, L.Y. Kravets, A.A. Potapov, E.V. Zagaynova, and N.D. Gladkova, "Cross-Polarization Optical Coherence Tomography for Brain Tumor Imaging," *Front. Oncol.*, vol. 9, p. 201, 2019.
- [7] Plekhanov A.A., Sirotkina M.A., Sovetsky A.A., E.V. Gubarkova, S.S. Kuznetsov, A.L. Matveyev, L.A. Matveev, E.V. Zagaynova, N.D. Gladkova, and V.Y. Zaitsev, "Histological validation of in vivo assessment of cancer tissue inhomogeneity and automated morphological segmentation enabled by Optical Coherence Elastography," *Sci. Rep.*, vol. 10(1), p. 11781, 2020.
- [8] G.O. Grechkanev, A.A. Plekhanov, M.M. Loginova, E.A. Avetisyan, A.A. Shepeleva, A.M. Zaitseva, A.A. Ushanova, S.V. Gamayunov, M.A. Sirotkina, V.Yu. Zaitsev, N.N. Nikishov, N.D. Gladkova, "First experience of using multimodal optical coherence tomography for diagnostics of hyperplastic processes in the endometrium," *Russian Bul. Obstet. Gyn.*, vol. 23(5), pp. 66-72, 2023.

Влияние фотодинамической терапии с метиленовым синим и хлорином еб на метаболизм опухоли *in vivo* на мышинных моделях

Д.В. Поминова^{1,2}, А.В. Рябова^{1,2}, И.Д. Романишкин¹, И.В. Маркова², А.С. Скобельцин^{1,2}

¹ Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, Москва, Россия

² Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия

Аннотация — Проведено исследование влияния фотодинамической терапии с метиленовым синим и с совместным применением двух фотосенсибилизаторов (метиленовый синий и хлорин Еб) на метаболизм опухоли на мышинной модели карциномы Эрлиха. Исследовано влияние метиленового синего при внутривенном введении без облучения на метаболизм и прогрессию опухоли.

Ключевые слова — метиленовый синий; хлорин еб; гипоксия; фотодинамическая терапия.

I. ВВЕДЕНИЕ

Важными параметрами метаболизма опухоли, влияющих на эффективность противоопухолевой терапии, в частности фотодинамической терапии (ФДТ), являются гипоксия и высокое отношение $NADH/NAD^+$ [1, 2]. В данной работе исследована возможность использования метиленового синего (МС) для их коррекции. Согласно литературным данным, МС может восстанавливаться при взаимодействии с $NADH$ *in vivo*, в то время как $NADH$ окисляется до NAD^+ [3]. В зависимости от параметров микроокружения, МС может работать по первому типу фотодинамической реакции, что перспективно для терапии опухолей в состоянии гипоксии [4]. Было также показано, что МС может положительно влиять на оксигенацию опухоли [5]. Эти факты могут быть использованы для противоопухолевой терапии с МС и получения синергетического эффекта за счет повышения оксигенации опухоли при ФДТ с МС и хлорином еб.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для терапии с МС без облучения осуществляли внутривенное введение в дозе 10 и 20 мг/кг (1 и 7 день эксперимента) и введение перорально с питьевой водой из расчета суточной дозы 10 мг/кг в течение двух недель. Для ФДТ использовали одновременное введение хлорина еб (5 мг/кг) и МС (10 мг/кг) и облучение через час после введения и раздельное введение препаратов в тех же концентрациях, хлорин еб, через час МС и сразу же облучение. Параметры ФДТ: 660 нм, 100 мВт/см², 10 минут, 60 Дж/см². Для анализа типа клеточного дыхания по метаболическим сигнатурам $NADH$ использовали флуоресцентную время-разрешенную микроскопию при двухфотонном возбуждении 740 нм фемтосекундным лазером Chameleon Ultra II (Coherent,

США) с использованием модуля FLIM (Becker&Hickl, Германия).

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Исследование возможности подавления роста опухоли за счет коррекции клеточного метаболизма после введения МС продемонстрировало снижение скорости роста опухоли в группе, ежедневно получавшей МС с питьевой водой в дозе 10 мг/кг в течение двух недель. Введение МС способствует сдвигу времени жизни $NADH$ на фазорных диаграммах в сторону окислительного фосфорилирования. После проведения ФДТ с хлорином еб, МС и МС с хлорином еб отмечен хороший терапевтический эффект и уменьшение скорости роста опухоли по сравнению с контролем, особенно в группах с ФДТ с МС и при одновременном введении хлорина еб и МС. Уровень оксигенации опухоли на 3-е и 5-е сутки после ФДТ был выше в группах с облучением, самая высокая оксигенация на 5-е сутки после ФДТ отмечена в группе с ФДТ с МС. На фазорных диаграммах после проведения ФДТ наблюдается отклонение от метаболической траектории и сдвиг в сторону более длинного времени жизни по сравнению с контрольной опухолью, что указывает на наличие продуктов перекисного окисления липидов и разрушении опухолевых клеток под воздействием активных форм кислорода, образующихся при ФДТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] A. Chiarugi, C. Dölle, R. Felici, and M. Ziegler, 'The NAD metabolome — a key determinant of cancer cell biology', *Nat Rev Cancer*, vol. 12, no. 11, pp. 741–752, 2012.
- [2] A. Casazza, G. Di Conza, M. Wenes, V. Finisguerra, S. Deschoemaeker, and M. Mazzone, 'Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment', *Oncogene*, vol. 33, no. 14, pp. 1743–1754, 2014.
- [3] J. F. J. Engbersen, A. Koudijs, and H. C. Van Der Plas, 'Reaction of $NADH$ models with methylene blue', *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, vol. 104, no. 5, pp. 131–138, 1985.
- [4] H. C. Junqueira, D. Severino, L. G. Dias, M. S. Gugliotti, and M. S. Baptista, 'Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces', *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 4, no. 11, pp. 2320–2328, 2002.
- [5] D. Pominova, A. Ryabova, A. Skobeltsin, I. Markova, K. Linkov, and I. Romanishkin, 'The use of methylene blue to control the tumor oxygenation level', *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 46, p. 104047, 2024.

Коэффициент затухания ОКТ сигнала с разрешением по глубине для оценки степени поражения дермы при раннем Склерозирующем лихене вульвы

А.Л. Потапов¹, М.М. Логинова¹, А.А. Моисеев², И.А. Кузнецова^{1,3}, Н.Д. Гладкова¹, М.А. Сироткина¹, С.Г. Раденская-Лоповок⁴

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

²Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, Россия

³Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко, Нижний Новгород, Россия

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Аннотация – В данной работе проведена оптическая когерентная томография (ОКТ) кожи вульвы, пораженной склерозирующим лихеном (СЛВ) с дальнейшим расчётом коэффициента затухания сигнала с разрешением по глубине. Продемонстрирована возможность отличить менее выраженную степень поражения дермы (начальную) от нормы, с помощью количественных значений коэффициента затухания ОКТ сигнала в дерме.

Ключевые слова — оптическая когерентная томография, коэффициент затухания, склерозирующий лихен, вульва.

I. ВВЕДЕНИЕ

СЛВ является главной причиной деструкции анатомической структуры вульвы и приводит к значительному снижению качества жизни женщин. Главный принцип лечения сводится к ранней диагностике и лечению заболевания, когда еще отсутствует необратимое рубцевание вульвы. Однако проблема ранней диагностики до сих пор не решена, так задержка в диагностике составляет около 5 лет. ОКТ является методом «оптической биопсии» и за счет неинвазивности позволяет многократно проводить исследование области вульвы и не требует строгих показаний как биопсия. Расчёт коэффициента затухания позволяет проводить количественный анализ свойств ткани из сигнала ОКТ, что повышает точность диагностики.

Цель исследования – определить количественные показатели коэффициента затухания ОКТ сигнала с разрешением по глубине для начальной морфологической степени поражения дермы при СЛВ.

II. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

Исследование включало 15 пациенток с гистологически подтвержденным ранним СЛВ и 8 пациенток без патологии вульвы. Исследование проведено с использованием системы «ОКТ 1300-Е» (ООО «Биомедтех», Нижний Новгород). Полученные 3D массивы данных обрабатывались для получения цветокодированных карт коэффициента затухания в поперечном сечении (В-скан). Далее рассчитывались значения коэффициента затухания ОКТ сигнала с разрешением по глубине в дерме.

Результаты

Результаты количественного анализа позволили статистически значимо ($p < 0.01$) идентифицировать самую раннюю, начальную степень ($4,77 \pm 1,3 \text{ мм}^{-1}$) поражения от легкой ($7,05 \pm 0,8 \text{ мм}^{-1}$), умеренной ($4,49 \pm 0,3 \text{ мм}^{-1}$), тяжелой ($2,03 \pm 0,3 \text{ мм}^{-1}$), а также от нормы ($7,95 \pm 1,3 \text{ мм}^{-1}$). При визуальной оценке цветокодированных карт коэффициента затухания в проекции В-скан отмечалось сниженное количество щелевидных структур в дерме (лимфатических сосудов), снижения контраста дермо-эпидермального соединения, а также снижения количественных значений коэффициента, что выражалось в зелено-голубой палитре относительно нормы (желто-красная палитра).

III. ВЫВОДЫ

Продемонстрировано, что количественная оценка ОКТ сигнала с расчётом коэффициента затухания позволила достоверно отличить самую раннюю степень поражения от нормы. Это может позволить провести неинвазивную диагностику в режиме реального времени без использования биопсии.

Интраоперационная флуоресцентная диагностика *in vivo*

Е.В. Потапова

ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», Орёл, Россия

Аннотация — Описаны результаты применения методов флуоресцентной спектроскопии в интраоперационной диагностике у пациентов с онкологическими заболеваниями печени и молочных желез, а также с синдромом механической желтухи.

Ключевые слова — флуоресцентная спектроскопия; флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением; онкология; печень; механическая желтуха; рак молочной железы

I. ВВЕДЕНИЕ

Использование флуоресцентных методов позволяет обнаруживать биохимические изменения в тканях, связанные с патологическими метаболическими перестройками. В основу метода флуоресцентной спектроскопии (ФС) заложена регистрация спектров автофлуоресценции биотканей в результате её возбуждения оптическим излучением. Метод ФС с временным разрешением построен на регистрации и последующем анализе кривых динамики затухания флуоресценции. Методы ФС легко интегрируются в существующие инструменты для хирургии, позволяя разрабатывать новые технологии интраоперационной навигации и диагностики.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В НТЦ биомедицинской фотоники (ОГУ им. И.С. Тургенева) были разработаны программно-аппаратные комплексы для интраоперационной диагностики при проведении пункционных и дренажных малоинвазивных вмешательств, имеющие каналы ФС и ФС с временным разрешением [1-4]. Пилотные клинические исследования с применением данных комплексов позволили решить ряд медицинских диагностических задач.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ

Регистрация и анализ спектров флуоресценции во время выполнения чрескожной пункционной биопсии печени позволили разработать метод дифференциации нормальной паренхимы и новообразований печени с чувствительностью и специфичностью 0,75 и 0,85, соответственно [1]. Применение метода ФС с временным разрешением в этой же клинической задаче не только дало возможность различать здоровые и опухолевые ткани с чувствительностью более 0,94 и специфичностью более 0,81, но и формулировать предварительный диагноз типа новообразования печени (первичная злокачественная, метастазы и доброкачественные опухоли) с чувствительностью и специфичностью не менее 0,80 и 0,95 [2].

На основе постобработки спектров флуоресценции, зарегистрированных в паренхиме печени интраоперационно во время проведения дренажных вмешательств у пациентов с синдромом механической желтухи, были рассчитаны вклады флуорофоров (НАДН, коллаген, билирубин, порфирины и т.д.) в общий сигнал флуоресценции [3], которые впоследствии легли в основу построения классификаторов для выявления больных с тяжелой степенью печеночной недостаточности.

Использование ФС в диагностике рака молочной железы показало, что злокачественные опухоли имеют более высокие значения интенсивности флуоресценции на длине волны возбуждения 365 нм [4], что, вероятно, связано с накоплением кофермента НАДН или изменениями коллагенового матрикса, что может применяться для улучшения результатов прицельных биопсий под ультразвуковым контролем, а также для оценки лечебного патоморфоза рака молочной железы.

IV. ВЫВОДЫ

Интраоперационная флуоресцентная диагностика обладает высоким диагностическим потенциалом и может применяться при проведении малоинвазивных хирургических вмешательств с целью корректировки лечебных протоколов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00487, <https://rscf.ru/project/23-25-00487/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] V. Dremin, E. Potapova, E. Zherebtsov, K. Kandurova, V. Shupletsov, A. Alekseyev, A. Mamoshin, and A. Dunaev, "Optical percutaneous needle biopsy of the liver: A pilot animal and clinical study," *Sci. Rep.* vol. 10, p. 1420, August 2020.
- [2] E. A. Zherebtsov, E. V Potapova, A. V Mamoshin, V. V Shupletsov, K. Y. Kandurova, V. V Dremin, A. Y. Abramov, and A. V Dunaev, "Fluorescence lifetime needle optical biopsy discriminates hepatocellular carcinoma," *Biomed. Opt. Express*, vol. 13(2), pp. 633-646, February 2022.
- [3] K.Y. Kandurova, D.S. Sumin, A.V. Mamoshin, E.V. Potapova, "Deconvolution of the fluorescence spectra measured through a needle probe to assess the functional state of the liver," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 55(7), pp. 690-701, June 2023.
- [4] М.И. Арабчян, В.В. Шуплецов, М.Ю. Кириллин, А.В. Дунаев, Е.В. Потапова, "Метод оценки местного метаболизма опухолей молочных желез на основе мультимодальной оптической технологии," *Онкологический журнал: лучевая диагностика, лучевая терапия*, Том 7(2), С. 37-45, июль 2024.

Оптические признаки снижения регенераторного потенциала печени при патологии

С.А. Родимова¹, В.В. Елагин¹, А.М. Можеров^{1,2}, И.Д. Щечкин¹, Д.П. Крылов^{1,2}, Д.С. Козлов^{1,2}, А.И. Гаврина¹,
Н.В. Бобров^{1,3}, В.Е. Загайнов^{1,4}, Е.В. Загайнова^{1,5}, Д.С. Кузнецова^{1,2}

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

² Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

³ Приволжский окружной медицинский центр, Нижний Новгород, Россия

⁴ ГАУЗ НО НИИКО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер», Нижний Новгород, Россия

⁵ ФНКЦ Физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

Аннотация — На основе методов мультифотонной микроскопии, генерации второй оптической гармоники и FLIM были выявлены новые оптические признаки снижения регенераторного потенциала печени при стеатозе и фиброзе для экспресс интраоперационной оценки состояния печени при сопутствующей патологии.

Ключевые слова — мультифотонная микроскопия; FLIM; генерация второй гармоники; регенерация печени; патология печени.

I. ВВЕДЕНИЕ

Резекция печени остается наиболее эффективным методом лечения первичного и вторичного рака печени [1]. Однако при наличии печеночной патологии регенераторный потенциал существенно снижается [2]. Стандартные методы представленные в клинике недостаточно эффективны для прогнозирования эффективности регенерации печени, а также для экспресс оценки наличия патологии. Современные label-free методы мультифотонной микроскопии, генерации второй гармоники (ГВГ) и FLIM микроскопии эффективны для экспресс интраоперационной оценки состояния печени.

II. РАЗДЕЛ I

A. Материалы и Методы

Эксперименты проводили на крысах линии Wistar. Фиброз печени индуцировали путем введения СС14, стеатоз индуцировали с применением диеты с 60% содержанием

жиров. На разных стадиях патологии индуцировали регенерацию путем 70% гепатэктомии (ГЭ). С применением мультифотонной микроскопии оценивали интенсивность флуоресценции НАД(Ф)Н в ткани печени на 3 и 7 день регенерации. С применением FLIM анализировали вклады времен жизни флуоресценции свободной и связанной формы НАДН (a2,%) и НАДФН (a3,%). Для верификации проводили стандартный морфологический анализ и биохимический анализ крови.

B. Результаты

Были выявлены характерные оптические признаки состояния печени на разных этапах регенерации при стеатозе и фиброзе. При патологии были выявлены зоны со сниженным сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н, ассоциированные с зонами липидной инфильтрации и/или очагами фиброза. Площадь таких зон увеличивалась по мере развития патологии. Методом FLIM показано отсутствие резкого увеличения значений a2 и a3 при патологии, что не соответствует условиям успешной регенерации. Выявленные оптические признаки могут быть успешно транслированы в клинику.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [5] E. Ramos., J. Torras., L. Lladó. et al., The influence of steatosis on the short-and long-term results of resection of liver metastases from colorectal carcinoma, *Hpb*, 18(4), 389-396 (2016).
- [6] V.E. De Meijer, B.T. Kalish, M., Puder, J.N.M. IJzermans, Systematic review and meta-analysis of steatosis as a risk factor in major hepatic resection, *Journal of British Surgery*, 97(9), 1331-1339, (2010).

Влияние метиленового синего на клеточный метаболизм и сенсibilизацию вторым фотосенсibilизатором хлорином еб

А.В. Рябова^{1,2}, И.Д. Романишкин¹, И.В. Маркова², Д.В. Поминова^{1,2}

¹ Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, Москва, Россия

² Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия

Аннотация — В докладе представлены результаты исследования фотодинамических реакций метиленового синего, обладающего окислительно-восстановительными свойствами, и его влияние на сенсibilизацию вторым фотосенсibilизатором хлорином еб на клеточных культурах *in vitro*.

Ключевые слова — метиленовый синий; хлорин еб; фотосенсibilизатор; активные формы кислорода; гипоксия; фотодинамическая терапия.

I. ВВЕДЕНИЕ

Эффективность противоопухолевой терапии, в частности фотодинамической терапии (ФДТ), отрицательно зависит от гипоксии. Одним из подходов к преодолению ограничений, связанных с гипоксией, является использование фотосенсibilизаторов, работающих по первому механизму фотодинамической реакции. В зависимости от параметров микроокружения таким фотосенсibilизатором может быть метиленовый синий (МС). МС принимает электроны от восстановительных эквивалентов в митохондриях и передает их другим компонентам дыхательной цепи или молекулярному кислороду. Кроме того, МС склонен к образованию димеров и переходу в лейко-форму. Хлорин еб - фотосенсibilизатор II типа, генерирующий преимущественно синглетный кислород ¹O₂.

Ранее нами было показано, что МС может положительно влиять на оксигенацию опухоли [1]. В настоящей работе проведено исследование фотодинамической активности МС и МС в комбинации с хлорином еб на культуре клеток и оценено их влияние на клеточный метаболизм.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на клеточных культурах с использованием флуоресцентной конфокальной микроскопии (LSM-710-NLO, Carl Zeiss, Германия). Использовали флуоресцентный зонд MitoCLox, чувствительный к перекисному окислению кардиолипина, сенсор на ¹O₂ - SOSG, индикатор активных форм кислорода (АФК) 6-Карбокси-H₂DCFDA. Изменения в структуре митохондрий после инкубации клеток с МС были исследованы при помощи голомомографии (Tomocube HT-X1, Tomocube Inc., Корея).

Клетки инкубировали с МС [1, 5, 10 и 20 мг/мл] и хлорином еб [5 мг/мл] при 37°C, 5% CO₂ в течение часа. Параметры ФДТ: 660 нм, 100 мВт/см², 10 минут, 60 Дж/см². Флуоресцентные изображения регистрировали до облучения, сразу после облучения, и через день после облучения. Клетки окрашивали акридиновым оранжевым и йодидом пропидия для визуализации “живые/мертвые”. Для анализа типа клеточного дыхания по метаболическим сигнатурам NADH и FAD, уровня агрегации МС применяли флуоресцентную время-разрешенную микроскопию при двухфотонном возбуждении 740 нм фемтосекундным лазером Chameleon Ultra II (Coherent, США) с использованием модуля FLIM (Becker&Hickl, Германия).

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

МС эффективно генерирует АФК, перекисное окисление липидов, но обладает невысоким квантовым выходом генерации ¹O₂. Это подтверждает смещение МС от механизма фотосенсibilизации II типа к механизму типа I (перенос электрона с образованием полувосстановленных и полуокисленных радикалов МС).

Совместная инкубация клеток с МС и хлорином еб приводит к большей флуоресценции МС внутри клеток в сравнении с инкубацией клеток только с МС. Предположительно, хлорин еб меняет мембранный потенциал, что приводит к нарушению восстановления МС в лейко-форму. В результате ФДТ снижается уровень кислорода, отчего МС переходит в лейко-форму, или претерпевает фотообесцвечивание. ФДТ истощает уровень кислорода, что ведет к нарушению нормального клеточного метаболизма. Незначительный уровень гипоксии приводит к смещению типа дыхания в сторону анаэробного дыхания по метаболической траектории. Тяжелая гипоксия после фотодинамического воздействия приводит к расширению пятна NADH на фазорной диаграмме, клетки при этом погибают в результате некроза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] D. Pominova, A. Ryabova, A. Skobeltsin, I. Markova, K. Linkov, I. Romanishkin, “The use of methylene blue to control the tumor oxygenation level”, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol.146, 104047, 2024.

Особенности автофлуоресцентного профиля периферических лимфоцитов пациентов с меланомой по сравнению со здоровыми донорами

М.М. Сажина¹, А.В. Изосимова¹, Д.А. Сачкова^{1,2}, И.С. Шумская³, А.М. Можеров¹, В.И. Щеславский¹, М.В. Ширманова¹, Д.В. Южакова¹

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

² ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

³ Нижегородский областной клинический онкологический диспансер, Нижний Новгород, Россия

Аннотация — Развитие персонализированной медицины в области иммунотерапии опухолей затруднено из-за отсутствия надежных предикторов эффективности терапии. Мы показали возможности использования метода FLIM для прогнозирования ответа на терапию чекпойнт ингибиторами у индивидуальных пациентов до начала лечения.

Ключевые слова — меланома; чекпойнт иммунотерапия; FLIM.

I. ВВЕДЕНИЕ

Согласно практическим рекомендациям по лекарственной терапии меланомы приоритет первой и последующих линий терапии отдается иммунотерапии чекпойнт ингибиторами, однако она вызывает выраженный ответ лишь у части пациентов. Одним из последних достижений биомедицинских технологий, способствующих развитию персонализированной медицины в терапии онкологии, является применение биомаркеров для оценки прогноза и выбора адекватной лечебной тактики. Несмотря на их огромное количество, не все из них подходят для рутинного использования в клинической практике и могут точно предсказать эффективность лечения. Таким потенциальным надежным предиктором может стать автофлуоресцентный профиль метаболических коферментов в циркулирующих Т-клетках, оцененный с помощью флуоресцентной времяразрешенной микроскопии (FLIM), так как он позволяет проследить ключевые изменения в лимфоцитах при активации и терапии.

II. РАЗДЕЛ I

Исследование проводили с использованием материала от 10 пациентов (фракция лимфоцитов из периферической крови) с ранее не леченной нерезектабельной или метастатической меланомой III или IV стадии, которым будет назначена терапия пембролизумабом (НОКОД), а также 8 здоровых доноров. Автофлуоресценцию метаболического кофермента никотинамидадениндинуклеотида (фосфата) (НАД(Ф)Н) визуализировали с помощью флуоресцентного

конфокального микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) с FLIM-модулем TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Германия).

В ходе пилотного исследования Т-лимфоцитов пациентов с меланомой по сравнению со здоровыми донорами были определены два различных профиля автофлуоресценции НАД(Ф)Н. В последствии была установлена корреляция с положительным и отрицательным ответами на терапию. В первую группу вошли пациенты, у которых было зафиксировано изменение в сторону более высоких значений относительного вклада свободной фракции НАДН α1 в большинстве Т-клеток, ассоциированное со сдвигом в сторону гликолиза для поддержания цитотоксических функций, гетерогенное увеличение времени жизни связанной компоненты НАДН τ2, ассоциированной с изменением профиля НАДН-связывающих белков, и появление в значительной части клеток вклада фосфорилированной формы НАДФН α3, ассоциированной с усилением пентозофосфатного пути для стабилизации уровней пролиферации и биосинтеза. В последующем данная группа пациентов демонстрировала частичный ответ на терапию пембролизумабом. Другую группу составили пациенты с тенденцией к сохранению на прежнем уровне либо снижению НАДН α1 при высокой степени внутренней гетерогенности, заметным снижением значений НАДН τ2 и отсутствием фракции НАДФН α3, что может быть ассоциировано со торможением метаболических процессов Т-клеток. Впоследствии данные пациенты демонстрировали прогрессирование опухоли в ходе лечения.

Таким образом, дальнейшее изучение базового профиля Т-клеток пациентов в качестве предиктора эффективности лечения в будущем может позволить развивать персонализированные подходы к иммунотерапии опухолей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] A. Naimi, R.N. Mohammed, A. Raji et al. "Tumor immunotherapies by immune checkpoint inhibitors (ICIs); the pros and cons". Cell Commun Signal, vol. 20, April 2022.

Оценка автофлуоресцентных характеристик глиальных опухолей пациентов *ex vivo* методом FLIM-макроимиджинга для разработки подхода оптической биопсии глиом

Д.А. Сачкова^{1,2}, Е.Б. Киселева¹, Е.Л. Бедерина¹, А.С. Гришин¹, В.И. Щеславский¹, Л.С. Кухнина¹, М.В. Ширманова¹, К.С. Яшин¹

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия

Аннотация — Низкая эффективность терапии является ключевой проблемой лечения злокачественных глиом. Возможным решением проблемы может стать разработка подходов к прижизненной интраоперационной диагностике границ резекции опухоли на основе флуоресцентного время-разрешенного имиджинга с макроскопическим разрешением (FLIM-макроимиджинг).

Ключевые слова — глиома, флуоресцентный время-разрешенный имиджинг, FLIM, интраоперационная диагностика.

I. ВВЕДЕНИЕ

Центральной проблемой в нейрохирургии высокозлокачественных глиом головного мозга является неполная резекция опухолевого узла. Для повышения эффективности терапии актуальной задачей является разработка методов прижизненной интраоперационной диагностики границ резекции опухоли. Перспективным методом для решения этой задачи может выступать метод флуоресцентного время-разрешенного имиджинга с макроскопическим разрешением (FLIM-макроимиджинг) на основе регистрации времени жизни эндогенной флуоресценции тканей.

II. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить параметры времени жизни автофлуоресценции различных тканей головного мозга пациентов с злокачественными глиомами на основе регистрации времени жизни автофлуоресценции тканей с использованием FLIM-макроимиджинга.

III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на свежих послеоперационных образцах тканей головного мозга (нормальное белое вещество, перитуморальное белое вещество, опухоль) размерами 0.6 – 1 мм³, полученных в результате резекции у 19 пациентов с глиомами различной степени злокачественности (Grade 2-4). Визуализацию времени жизни автофлуоресценции в канале метаболического кофактора никотинамидадениндинуклеотида (фосфата) НАД(Ф)Н на макроуровне проводили с помощью конфокального

FLIM/PLIM макросканера (Becker&Hickl, Германия) (возб. 375 нм, рег. 435 – 485 нм). Для каждого образца проводилось гистологическое исследование для определения типа ткани и степени злокачественности опухоли (окраска гематоксилином и эозином).

IV. РЕЗУЛЬТАТЫ

С использованием FLIM-макроимиджинга были оценены параметры времени жизни эндогенной флуоресценции тканей мозга. Самая высокая гетерогенность значений параметров была выявлена для образцов перитуморального белого вещества, которые варьировали у различных пациентов от 0,53 нс до 1,65 нс для τ_m , от 2,14 нс до 4,16 нс для τ_2 , от 84,05% до 70,68% для α_1 . Полученные данные отражают межпациентскую гетерогенность.

Было продемонстрировано, что образцы нормальной ткани головного мозга пациентов отличаются по автофлуоресцентным характеристикам от перитуморальной и опухолевой тканей. В среднем, образцы перитуморального белого вещества и опухоли характеризовались более длинными временами жизни τ_m и τ_2 по сравнению с нормальным белым веществом ($p < 0.05$). Кроме того, наблюдалась тенденция к снижению вклада α_1 в образцах перитуморального белого вещества и опухоли по сравнению с нормальной тканью белого вещества мозга.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование с использованием технологии FLIM-макроимиджинга может служить перспективным заделом для дальнейшей разработки подхода оптической биопсии глиом пациентов.

Система для внутриклеточного имиджинга РНК-белковых конденсат

Ю.И. Светлова¹, В.В. Северов¹, Е.К. Книжник¹, В.А. Долгушева¹, П.В. Рубцов¹, А.М. Варижук¹, А.А. Аралов², Т.С. Ведехина¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение федеральный Научно-Клинический Центр Физико-Химической Медицины им. Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического агентства России, ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Биоорганической Химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии Наук, ИБХ РАН, Москва, Россия

Исследование направлено на оптимизацию системы аптамер-флуороген для внутриклеточного имиджинга структурированных РНК. Для этого были получены двумодульные РНК-конструкции. Один модуль представляет собой целевую РНК-последовательность – микросателлитные повторы генома человека или фрагменты генома вируса, часто имеющие неклассические вторичные структуры. Второй модуль – это РНК-аптамер MangoII, квадруплекс, специфичный к низкомолекулярному флуорогену. В своей работе мы оцениваем увеличение квантового выхода флуоресценции флуорогенов при взаимодействии с двумодульными РНК, а также их селективность к аптамерному модулю. Подбор оптимального флуорогена позволит визуализировать динамику микросателлитных или вирусных РНК в клетке, а именно их упаковку в патогенные РНК-белковые конденсаты.

Внутриклеточный имиджинг, флуороген, РНК-аптамер, биоконденсаты, вирусная инфекция, нейродегенерация

I. ВВЕДЕНИЕ

Ряд РНК-белковых конденсатов являются маркерами нейродегенерации и смежных патологий, таких как боковой амиотрофический склероз и лобно-височная деменция [1]. Также подобные конденсаты формируются в ходе жизненного цикла некоторых вирусов (например, SARS-CoV-2), способствуя их репликации [2]. Из-за отсутствия эффективной терапии, помимо симптоматического лечения, актуальной задачей является разработка новых лекарств и их тестирование. Это потребует имиджинга конденсатов – маркеров патологий в живых клетках.

Основу РНК-имиджинга могут составить действующие по принципу “light-up” системы аптамер-флуороген. Однако применимость этих систем для РНК-компонентов патологических биоконденсатов под вопросом, так как РНК обычно содержат структурные элементы, сходные с аптамером и, как следствие, между целевым и аптамерным модулем может возникнуть кросс-реактивность. Нашей задачей была проверка селективности флуорогенов к аптамерному модулю в составе двумодульной конструкции и влияние аптамерного модуля на функциональность целевого, т.е. его способность включаться в конденсаты.

II. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

В качестве целевых последовательностей РНК из генома человека нами были выбраны повторы *C9orf72* и *DMPK*, экспансия которых является маркером высокого риска накопления токсичных РНК-белковых конденсатов и развития нейродегенеративных заболеваний класса протеинопатий. В качестве целевой последовательности вирусной РНК была выбрана шпилька SL5 из генома SARS-CoV-2, участвующая в образовании конденсатов с вирусным нуклеокапсидным белком. Для имиджинга этих РНК, основываясь на наших предыдущих наработках, мы предварительно отобрали РНК-аптамер MangoII и два флуорогена: тиазол оранжевый 1 и его производное [3].

Селективность флуорогенов оценивали методом флуориметрии, сравнивая параметры их флуоресценции в комплексе с двумодульной конструкцией, изолированным целевым модулем и изолированным аптамером. Взаимное влияние целевого и аптамерного модулей на фолдинг друг друга оценивали по данным спектроскопии кругового дихроизма. Влияние аптамерного модуля на функциональность целевого проверяли на примере *C9orf72*, визуализируя конденсаты с белком-партнером из семейства hnRNP методом флуоресцентной микроскопии.

В результате работы было показано, что в составе двумодульной конструкции с *C9orf72* сохраняется и фолдинг обоих модулей, и специфичность флуорогена к аптамеру. Конструкция потенциально пригодна для внутриклеточного имиджинга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Solomon D.A. et al. Altered Phase Separation and Cellular Impact in C9orf72-Linked ALS/FTD // Front. Cell. Neurosci. Frontiers, 2021. Vol. 15.
- [2] Liquid-Liquid Phase Separation by Intrinsically Disordered Protein Regions of Viruses: Roles in Viral Life Cycle and Control of Virus-Host Interactions [Electronic resource]. URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/23/9045> (accessed: 27.03.2024).
- [3] Bychenko O.S. et al. Red light-emitting short Mango-based system enables tracking a mycobacterial small noncoding RNA in infected macrophages // Nucleic Acids Res. 2023. Vol. 51, № 6. P. 2586–2601.

Оценка степени компактизации ДНК и РНК с помощью низкочастотной спектроскопии комбинационного рассеяния

А.Ю. Сосорев^{1,2}, О.Д. Паращук¹, А.А. Трубицын¹, О.Г. Харланов¹, И.В. Чичерин¹, Н.О. Дубинец², П.А. Каменский¹, Д.Ю. Паращук¹

¹МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт синтетических полимерных материалов РАН, Москва, Россия

Аннотация — Предложена новая методика оценки степени компактизации нуклеиновых кислот с помощью низкочастотной спектроскопии комбинационного рассеяния. Методика апробирована на различных образцах ДНК и РНК. Показана возможность применения методики для картирования степени компактизации хроматина в ядре клетки.

Ключевые слова — компактность, динамический беспорядок, хроматин, колебательная микроспектроскопия

I. ВВЕДЕНИЕ

Конформация биомолекул играет ключевую роль во многих физических процессах, происходящих в клетках. В частности, степень компактизации ДНК в различных областях клеточного ядра определяет, должны ли в них экспрессироваться гены и протекать другие важнейшие клеточные процессы, например, репликация и репарация ДНК. В связи с этим, весьма актуально развитие подходов к экспериментальной оценке компактности ДНК в ядрах клеток, а также её индикатора, динамического беспорядка — степени тепловой флуктуации положения и взаимной ориентации молекулярных фрагментов, которая уменьшается с увеличением степени компактизации [1]. Недавно для другой молекулярной системы — молекулярных кристаллов органических полупроводников — нами было показано, что интенсивность спектра комбинационного рассеяния (КР) различных низкочастотных (НЧ, частота менее 200 см^{-1}) колебаний связана со вкладом этих колебаний в динамический беспорядок [2,3], а отношение интенсивности КР в НЧ области к интенсивности в высокочастотной (ВЧ, $>200\text{ см}^{-1}$) области может быть использовано для оценки динамического беспорядка [4].

II. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе показано, что предложенный подход может быть расширен на оценку динамического беспорядка в биомолекулах, в частности, ДНК и РНК, что позволит оценивать степень их компактизации. Экспериментально обнаружено, что отношение интенсивности КР в НЧ и ВЧ области существенно (на порядок величины) различается для разных образцов ДНК, в которых предполагается различие степени компактизации (Рис. 1). Компьютерное моделирование также подтверждает корреляцию между

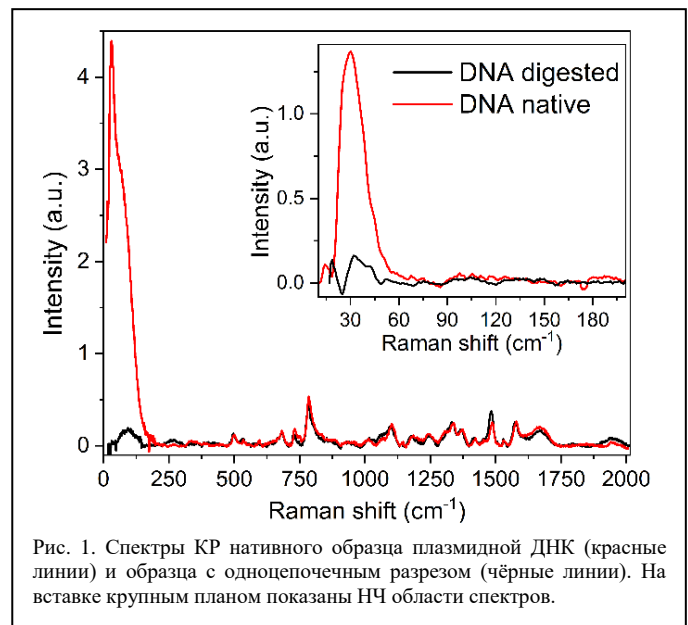


Рис. 1. Спектры КР нативного образца плазмидной ДНК (красные линии) и образца с одноцепочечным разрезом (чёрные линии). На вставке крупным планом показаны НЧ области спектров.

степенью компактизации, динамическим беспорядком и НЧ интенсивностью КР. В результате, предложен способ оценки степени компактизации нуклеиновых кислот на основе НЧ КР спектроскопии. Показано, что данный подход позволяет оценивать степень компактизации ДНК в различных областях ядра клетки. Результаты опубликованы в работе [1,5]. Ожидается, что использование предложенной методики должно способствовать пониманию ключевых клеточных процессов и обуславливающих их физических механизмов, которое необходимо для развития передовых методов молекулярной биофизики и клеточной биологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Р. Г. Ефремова и А. О. Чугунова (ИБХ РАН) за плодотворные обсуждения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] A. Yu. Sosorev et al., Phys. Chem. Chem. Phys., 26, 17467, 2024.
- [2] M.V. Vener et al., Adv. Electron. Mater. 7, 2001281, 2021.
- [3] A. Yu. Sosorev et al., Phys. Chem. Chem. Phys. 23, 15485, 2021.
- [4] O.G. Kharlanov et al., Adv. Electron. Mater. 7, 2100579, 2021.
- [5] А. Ю. Сосорев и соавт. ВМУ. Серия 3. Физика. Астрономия. 79, 2420402, 2024

Рациональный дизайн генетически кодируемых флуорофоров за счет трансляционного введения канонических и неканонических аминокислот

В.В. Терехова¹, Д.В. Бодунова¹, Е.С. Горохов¹, С.В. Сидоренко¹, Р.А. Васильев¹, С.А. Левицкий¹, Ю.А. Богданова², М.С. Баранов², Е.Г. Максимов¹

¹ Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова (МГУ), Биологический факультет, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), Москва, Россия

Рациональный дизайн белков с неканоническими аминокислотами, основанный на квантово-химических расчетах, молекулярной динамике и расчете сетей молекулярных взаимодействий позволяет перейти от стадии проб и ошибок стандартного рекомбинантного мутагенеза к управляемой гипотезами белковой инженерии. Это открывает новые возможности биотехнологического получения белков с принципиально новой функциональной активностью, в том числе флуоресцентных.

флуоресцентные белки; флуоресцентная микроскопия; квантовый выход; неканонические аминокислоты

Аминокислоты являются строительными блоками белков, они определяют их структуру и функцию за счет межмолекулярных взаимодействий. Однако набор природных аминокислот ограничен всего 20 типами, что очевидно является недостаточным даже для осуществления всего многообразия природных функций белков, и именно поэтому для функционирования многих белков и ферментов необходимы дополнительные кофакторы или посттрансляционная модификация. В связи с этим дизайн белков *de novo* с заданными функциями на основе ограниченного набора элементов остается сложной задачей и часто сводится к копированию комбинаций природных белковых последовательностей.

Целью нашего исследовательского проекта является создание на базе биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова научного консорциума в области синтетической биологии для разработки технологий белковой инженерии и получения опыта создания белковых препаратов с неканоническими аминокислотами для решения актуальных задач биологии.

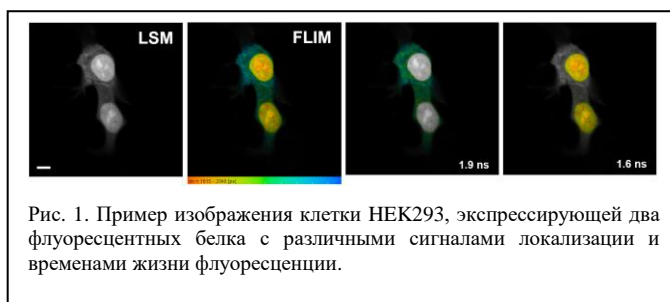


Рис. 1. Пример изображения клетки HEK293, экспрессирующей два флуоресцентных белка с различными сигналами локализации и временами жизни флуоресценции.

Для отработки технологии трансляционного введения неканонических аминокислот нами выбраны флуоресцентные белки, как наиболее перспективный класс генетически кодируемых молекулярных инструментов. Исследовательские задачи проекта включают круг вопросов связанных с направленной модификацией белковых комплексов для улучшения их спектральных характеристик и функциональных свойств и последующего применения в биотехнологических, аналитических и терапевтических приложениях.

В рамках доклада будут представлены некоторые результаты проекта в области модификации флуоресцентных белков для получения изображений с помощью лазерной сканирующей микроскопии с пикосекундным временным разрешением (Fluorescence Lifetime Imaging, FLIM). Данный подход позволяет различать множество спектрально идентичных флуорофоров по времени жизни возбужденного состояния, что открывает новые возможности для мультипараметрической и функциональной визуализации.

Оптическая диффузионная спектроскопия биотканей и ее применение в биомедицинских задачах

И.В. Турчин¹, В.В. Перекатова¹, А.Б. Костюк¹, А.Г. Орлова¹, А.В. Хилов¹, Е.А. Сергеева¹, К.А. Былинская¹, М.Ю. Кириллин¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-Грехова Российской академии наук», Нижний Новгород, Россия

Аннотация — разработан прибор для оптической диффузионной спектроскопии (ОДС) с самокалибрующимся оптоволоконным щупом, позволяющий измерять диффузное отражение тканей с высокой точностью в широком спектральном диапазоне (450-1030 нм). Разработаны новые модели распространения света в тканях, позволяющие более точно решать обратную задачу ОДС в сравнении с традиционно используемыми аналитическими моделями. Прибор успешно апробирован в ряде биомедицинских задач для экспериментальной онкологии и трансплантологии.

Ключевые слова — оптическая диффузионная спектроскопия, тканевые хромофоры, оксигенация, кровенаполнение

Оптическая диффузионная спектроскопия (ОДС) – метод исследования тканей, основанный на их облучении широкополосным излучением видимого и(или) ближнего инфракрасного диапазона длин волн и регистрацией диффузно рассеянного тканью излучения. Численная обработка зарегистрированного спектра позволяет реконструировать концентрации тканевых хромофоров (оксигенированный и деоксигенированный гемоглобин, вода, липиды, меланин, коллаген и др.), используя данные об их парциальных спектрах поглощения, а так же модель распространения света в тканях. ОДС применяется для решения различных биомедицинских задач: исследования функции мозга, определения границ опухолей, дифференциальной диагностики новообразований, мониторинга лечения злокачественных новообразований, диагностики кожных заболеваний и др. Точность реконструкции концентраций хромофоров зависит от двух ключевых факторов – точности измерений спектров экстинкции, т.е. учета инструментальных характеристик измерительной ОДС-системы (спектральная яркость источника, чувствительность детектора, переходные функции волокон), и точности физической модели, описывающей распространение света в тканях, применяемой для реконструкции концентраций хромофоров. Для повышения точности измерений может использоваться метод самокалибровки, основанный на

измерениях двумя источниками и двумя детекторами, расположенными симметрично относительно друг друга (при этом для каждого источника измерения проводятся на обоих детекторах). Несмотря на увеличение времени измерений в данном методе, он обладает явным преимуществом по точности по сравнению с традиционным радиометрическим подходом, в котором используется одно зондирующее и два приемных волокна, а так же позволяет уменьшить влияние оптических неоднородностей в области контакта оптоволоконного щупа с тканью. Разработанный в ИПФ РАН прибор для широкополосной ОДС с самокалибрующимся щупом [1] был успешно применен в различных биомедицинских исследованиях, в частности для оценки приживаемости кожных трансплантатов [2], для исследования динамики физиологических параметров опухоли при химиотерапии.

Исследованы различные модели распространения света в ткани для решения обратной задачи ОДС, а так же предложена новая полуаналитическая модель, основанная на фитировании данных Монте-Карло моделирования, полученных для широкого диапазона оптических характеристик тканей - показателя поглощения и транспортногo показателя рассеяния.

БЛАГОДАРНОСТИ

Проект выполнен в рамках программы НЦМУ “Центр фотоники” при финансовой поддержке Минобрнауки, соглашение № 075-15-2022-316

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Perekatova, V.; Kostyuk, A.; Kirillin, M.; Sergeeva, E.; Kurakina, D.; Shemagina, O.; Orlova, A.; Khilov, A.; Turchin, I. VIS-NIR Diffuse Reflectance Spectroscopy System with Self-Calibrating Fiber-Optic Probe: Study of Perturbation Resistance. *Diagnostics* 2023, 13, 457
- [2] Turchin, I.; Beschastnov, V.; Peretyagin, P.; Perekatova, V.; Kostyuk, A.; Orlova, A.; Koloshein, N.; Khilov, A.; Sergeeva, E.; Kirillin, M.; Ryabkov, M. Multimodal Optical Monitoring of Auto- and Allografts of Skin on a Burn Wound. *Biomedicines* 2023, 11, 351

Визуализация изменений микровязкости мембран опухолевых клеток HeLa при ФДТ с использованием FLIM микроскопии и молекулярных роторов

А.Э. Хлынова¹, Л.Е. Шимолина¹, А.М. Можеров¹, М.К. Куимова², М.В. Ширманова¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

²Имперский колледж Лондона, Южный Кенсингтон, Лондон, Великобритания

Аннотация — Изменение вязкостных свойств мембран опухолевых клеток при терапевтическом воздействии может служить полезным индикатором об ответе клетки на лечение. Однако исследования изменений микровязкости мембраны в ответе на фотодинамическую терапию (ФДТ) проводились только на модельных мембранах или *in vitro*, в то время как исследования на более сложноорганизованных моделях не проводились. На сегодняшний день наиболее эффективным методом измерения микровязкости является FLIM-микроскопия (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) с применением флуоресцентных молекулярных роторов на основе BODIPY.

Ключевые слова — микровязкость, цитоплазматическая мембрана, FLIM, молекулярные роторы, раковые клетки, фотодинамическая терапия

I. ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на фундаментальное значение микровязкости мембраны живой клетки ее роль в патогенезе заболеваний и ответе на фотодинамическую терапию (ФДТ) до сих пор не изучена. Подобные исследования были проведены только на модельных мембранах и *in vitro*, в то время как на более сложноорганизованных моделях эксперименты не проводились. На сегодняшний день как эффективный метод измерения мембранной вязкости зарекомендовало себя сочетание флуоресцентной микроскопии с временным разрешением (FLIM) с чувствительными к вязкости флуоресцентными молекулярными роторами.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована клеточная линия Hela Kyoto (рак шейки матки человека), мыши линии Nude. ФДТ проводилась с использованием клинически одобренного фотосенсибилизатора Фотодитазин (ФЗ) в дозе 10 мкМ для клеток и сфероидов, для мышей - внутривенная инъекция, 5 мг/кг, длина волны облучения 659 нм. Диаметр светового пятна 10 мм, плотность мощности лазерного излучения 50 мВт/см². Время облучения - 4 мин 10 с, плотность энергии 10 Дж/см². Вязкость анализировали через 10 мин, 1, 3, 6, 24

и 48 ч. Для опухолей *in vivo* - через 24 ч и 7 дней после ФДТ. Изображения были получены с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Germany) с модулем FLIM (Becker&Hickl, Germany) длина волны возбуждения 850 нм, регистрация 500-550 нм.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании вязкостных изменений мембран клеточного монослоя было показано, что значения вязкости контрольных клеток, клеток, инкубированных с фотодитазинном и подвергшихся облучению, была одинаковой. Отмечено, что спустя 1-6 ч после ФДТ наблюдалось значительное снижение микровязкости у всех клеток.

В 3D клеточных сфероидов вязкость всех контрольных образцов клеток также была одинаковой. Спустя 3 ч и в течение 24 ч после воздействия наблюдалась тенденция к снижению вязкости, что согласуется с результатом для клеточного монослоя. Однако спустя 48 ч значения вязкости увеличились.

В эксперименте на мышах с опухолями *in vivo* было показано, что непосредственно после ФДТ наблюдалось статистически значимое повышение вязкости, а спустя неделю значение вязкости в опухолевых клетках были сравнимы с контрольными.

Таким образом, в ходе работы оценены изменения вязкости мембран клеточного монослоя, 3D опухолевых сфероидов и клеток опухолей *in vivo* при ФДТ с использованием фотодитазина. Полученные результаты могут быть полезны для оценки эффективности ответа опухолевой клетки на терапию.

Новые ИК излучающие комплексы лантанидов

Л.О. Целых¹, А.В. Орлова¹, Д.С. Кошелев¹, В.В. Уточникова¹
¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Получены новые координационные соединения лантанидов с эффективной ИК люминесценцией, которые были успешно протестированы как кандидаты в материалы для биовизуализации и люминесцентной термометрии, а также сенсоры на сульфид-анионы.

ИК люминесценция; комплексы лантанидов; люминесцентная термометрия; сенсор на сульфид.

I. ВВЕДЕНИЕ

ИК люминесценция сегодня находит целый ряд применений, таких как биовизуализация и термометрия, а также создание OLED. Интерес к ней связан, в том числе, с тем, что она попадает в окно прозрачности живых тканей. Координационные соединения (КС) лантанидов особенно интересны в связи с узостью полос люминесценции, что делает возможным детектирование их сигнала узкополосными фильтрами. Поэтому направленный синтез новых ИК люминесцирующих КС лантанидов является чрезвычайно важной задачей. В то же время из-за низкой эффективности сенсibilизации ИК люминесценции и простоты ее тушения эта задача также является непростой.

II. РАЗДЕЛ I

A. Подвышение эффективности ИК люминесценции

Данная работа посвящена последним результатам по созданию КС лантанидов с эффективной ИК люминесценцией, полученным в группе Люминесценции МГУ имени М.В. Ломоносова. При этом в качестве ИК излучающего иона в первую очередь использовали иттербий, его эмиссия приходится на 1000 нм. Для увеличения интенсивности ИК люминесценции использовали следующие приемы: а) повышения эффективности сенсibilизации и б) снижения тушения люминесценции.

Для увеличения эффективности сенсibilизации использовали как классический подход, а именно поиск анионных и нейтральных лигандов с низкой энергией триплетного уровня, так и новые подходы, в том числе получение гетерометаллических КС европия-иттербия, где возможна сенсibilизация люминесценции иттербия через ион европия. Этот способ позволяет также получать так называемые «dual-emissive» люминофоры, которые обладают узкополосной люминесценцией в видимом (612 нм) и ИК (1000 нм) диапазоне. Наличие двух полос люминесценции особенно перспективно для создания сенсоров, в том числе на рН или кислород, а также для люминесцентной термометрии.

Для устранения тушения применяли следующие приемы: а) использование нейтральных лигандов для

исключения тушения за счет колебаний молекул растворителя, б) синтез новых хелатирующих лигандов для получения безводных комплексов, а также в) получение гетерометаллических КС для устранения концентрационного тушения. При этом при поиске новых лигандов, обеспечивающих эффективную ИК люминесценцию, учитывали и необходимость обеспечить другие свойства, требуемые для практического применения ИК люминофоров: растворимость, нетоксичность, стабильность относительно диссоциации и др.

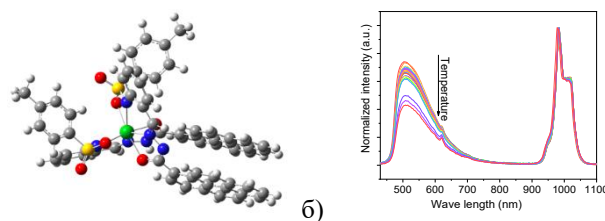


Рис. 1. а) Строение молекулы ИК излучающего комплекса и б) температурная зависимость его двойной – видимой и ИК – люминесценции в физиологическом температурном диапазоне

B. Тестирование ИК люминофоров

Полученные соединения с эффективной ИК люминесценцией были успешно протестированы как кандидаты в материалы для биовизуализации и люминесцентной термометрии. Кроме того, получены ИК излучающие комплексы, способные выступать в качестве сенсоров на сульфид-анионы.

ТАБЛИЦА

1

ЗНАЧЕНИЯ IC₅₀ ИК ЛЮМИНОФОРА И ЦИСПЛАТИНА (ДЛЯ СРАВНЕНИЯ) ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ РАКОВЫХ КЛЕТОК, μМ.

Compound	A-549	HCT-116	PC-3	MCF-7	WI-38
Yb(L)(HL)	68.3 ± 26.2	36.6 ± 12.7	31.2 ± 13	62.4 ± 18	94.8 ± 50
Cisplatin	2.6 ± 0.8	6.6 ± 0.4	3.4 ± 0.5	4.8 ± 0.5	5.2 ± 1.1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] D. Koshelev, L. Tselikh et al., “NIR-emitting ytterbium complexes with a large Stokes shift for detection of sulfide”, *J Lumin*, 263, 2023, 120054
- [2] Orlova A. et al., “Ytterbium 10-carboxyperylene-3,4,9-tricarboxylates for targeted NIR luminescent bioimaging”, *Dalton Trans.*, 2024,53, 3980-3984

Работа выполнена при поддержке РФФ (20-73-10053).

Цианоарилпорфиразины: перспективные мультифункциональные агенты для персонализированной фотодинамической терапии

Н.Ю. Шилягина¹, Л.Н. Шестакова^{1,2}, С.А. Лермонтова², Т.С. Любова², Л.Г. Клапшина², И.В. Балалаева¹

¹ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, ННГУ, Нижний Новгород, Россия

² Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева Российской академии наук, ИМХ РАН, Нижний Новгород, Россия

Фотодинамическая терапия (ФДТ) зарекомендовала себя как эффективный метод лечения поверхностных и неглубокозалегающих опухолей. Для создания «идеального» фотосенсибилизатора (ФС) по-прежнему нужны соединения с улучшенными свойствами или дополнительными модальностями. Особое внимание среди ФС привлекают цианоарилпорфиразины. Уникальное сочетание свойств ФС и сенсора вязкости, характерное для цианоарилпорфиразинов, способно стать инструментом для дозиметрии и адаптации схем лечения в ФДТ к индивидуальным особенностям каждого пациента.

Цианоарилпорфиразины; фотосенсибилизатор; фотодинамическая терапия; внутриклеточная вязкость

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой метод локальной активации светом накопившегося в ткани фотосенсибилизатора (ФС), что в присутствии внутриклеточного кислорода приводит к развитию фотохимических реакций и, в конечном итоге, к гибели клеток-мишеней. «Идеальный» ФС по-прежнему не найден, поэтому продолжается активный поиск соединений с улучшенными свойствами. Особый интерес в качестве ФС вызывают цианоарилпорфиразины (Pz).

Pz, описываемые в работе, были синтезированы в Институте металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева методом темплатной сборки макроцикла из молекул арилтрицианоэтиленов в качестве структурных единиц. Pz имеют типичные для порфиразинов спектры поглощения, содержащие полосу Soret и Q-полосу. Преимущество Pz по сравнению с клинически одобренными ФС заключается в чувствительности их флуоресцентных свойств к микроокружению. Квантовый выход и время жизни возбужденного состояния Pz, как молекулярных роторов, существенным образом возрастают при увеличении вязкости микроокружения, что позволяет использовать их в качестве сенсоров вязкости, в том числе при ФДТ.

Большинство исследуемых нами Pz эффективно накапливаются опухолевыми клетками различного происхождения, локализуясь в мембранных структурах клетки, таких как аппарат Гольджи, лизосомы и ЭПР, что хорошо согласуется с амфифильными свойствами Pz. Pz обладают высокой световой активностью в отношении

опухолевых клеток при незначительной темновой токсичности.

Pz эффективно загружаются как в органические, так и неорганические наноносители, такие как липосомы, полимерные наночастицы и ватерит. В дополнение к низкой темновой токсичности Pz инкапсуляция в наноразмерный носитель позволяет увеличить время их циркуляции в крови и повысить избирательность доставки в опухоли.

Нами было зарегистрировано увеличение времени жизни возбужденного состояния Pz в опухоли при фотодинамическом воздействии. Следует отдельно отметить, что это увеличение носит дозозависимый характер: при небольших световых дозах ответ, выраженный в увеличении времени жизни возбужденного состояния Pz в клетке, коррелирующего с возрастанием микровязкости, развивается в течение более длительного времени. Мы полагаем, что в перспективе оценка времени жизни возбужденного состояния Pz в опухоли позволит обеспечить возможность подбора эффективных световых доз в режиме реального времени в каждом индивидуальном случае. Продemonстрировано, что Pz способны индуцировать иммуногенную клеточную смерть: опухолевые клетки, подвергнутые ФДТ с Pz, послужили эффективной вакциной в модели профилактической противоопухолевой вакцинации *in vivo*, активируя адаптивную иммунную систему и обеспечивая эффективную защиту от роста опухоли после заражения жизнеспособными опухолевыми клетками.

Таким образом, проведенные исследования убедительно доказывают, что Pz можно рассматривать как эффективные агенты для ФДТ, позволяющие проводить дозиметрический контроль фотодинамического лечения и индуцировать иммуногенную гибель клеток, предотвращая тем самым прогрессию опухоли.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 075-15-2022-293 от 15.04.2022 г (проект о создании и развитии научного центра мирового уровня "Центр фотоники")

FLIM и PLIM в исследовании биологических эффектов фотодинамической терапии опухолей

М.В. Ширманова¹, Л.Е. Шимолина¹, В.В. Елагин¹, А.Э. Хлынова¹, М.А. Сироткина¹, Н.И. Игнатова¹, А.А. Плеханов¹, П.А. Буреев¹, В.И. Щеславский¹, М.М. Лукина², Е.В. Загайнова²

¹Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

Аннотация — В данной работе показано применение методов FLIM и PLIM для исследования механизмов фотодинамической терапии (ФДТ) опухолей. Представлены результаты исследований метаболического статуса клеток, уровня кислорода и микровязкости клеточной мембраны на клеточных культурах и опухолях животных.

Ключевые слова — флуоресцентный время-разрешенный имиджинг FLIM; фосфоресцентный время-разрешенный имиджинг PLIM; энергетический метаболизм; кислородный статус, микровязкость мембраны; опухолевая модель

I. ВВЕДЕНИЕ

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является перспективным фотофизическим методом лечения онкологических заболеваний, основанном на взаимодействии света с фотоактивными веществами – фотосенсибилизаторами. Прогресс в развитии этого метода зависит, в том числе, от понимания биологических механизмов ответа опухолей на терапию и изменений, предшествующих клеточной гибели. Методы флуоресцентного (FLIM) и фосфоресцентного (PLIM) время-разрешенного имиджинга на основе лазерной сканирующей микроскопии открывают широкие возможности для неинвазивного наблюдения различных процессов в живых клетках и тканях.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на клеточных культурах (HeLa, CT26) и опухолях, привитых подкожно мышам nude или Balb/c. Для получения флуоресцентных и фосфоресцентных изображений использован лазерный сканирующий микроскоп LSM 880 (Carl Zeiss) с опциями FLIM и PLIM (Becker&Hickl).

Измерения вязкости осуществлялись с использованием молекулярного флуоресцентного ротора BODIPY2 (Imperial College London). Оценку клеточного метаболизма проводили по соотношению свободной и связанной форм кофактора НАД(Ф)Н в затухание флуоресценции. Для анализа кислородного статуса использован фосфоресцентный сенсор ВТРDМ1 (Gunma University) на основе Ir(III).

В качестве фотосенсибилизаторов использованы Фотодитазин (Бета-Гранд) и генетически-кодированный фототоксичный белок KillerRed.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что после ФДТ с фотодитазином микровязкость мембраны клеток статистически значимо увеличивается. Данный эффект обнаружен как при воздействии на клеточные культуры, так и в опухолях животных *in vivo* [1]. Предполагаемый механизм увеличения вязкости – перекисное окисление мембранных липидов активными формами кислорода и изменения в липидном составе. При ФДТ с генетически-кодированным фотосенсибилизатором KillerRed, нацеленным либо на мембрану, либо на гистон H2B, обнаружено, что характер изменений микровязкости отличается для разных локализаций фотосенсибилизатора.

В *in vivo* экспериментах по изучению метаболического и кислородного статуса опухолей выявлено, что ФДТ с фотодитазином и KillerRed вызывает раннее снижение уровня кислорода в ткани и переход на более окислительный метаболизм на поздних сроках (>24 ч), связанный с торможением опухолевого роста [2].

Полученные результаты показывают, что механизмы ФДТ связаны, в том числе, с нарушением биофизического состояния клеточной мембраны и энергетического метаболизма клетки. Мониторинг этих изменений в перспективе поможет оптимизировать режимы ФДТ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Dr. Marina K. Kuimova, Dr. Seiji Tobita и чл.-корр. РАН К.А. Лукьянову за сотрудничество.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [3] Shirmanova, M.V.; Lukina, M.M.; Sirotkina, M.A.; et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25
- [4] L. E. Shimolina, A.E. Khlynova, A.A. Gulina, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 259 (2024) 11300

Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия (фототераностика) антибиотикорезистентных огнестрельных ран

А.А. Ширяев¹, М.П. Иванков², А.В. Войтова³, Н.А. Калягина^{3,4}, К.Т. Эфендиев³, А.М. Удинев³, А.В. Алехнович², И.В. Решетов¹, В.Б. Лощёнов^{3,4}

¹ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, кафедра онкологии, радиотерапии и реконструктивной хирургии, Университетская клиническая больница №1

²ФГБУ «НМИЦ ВМТ им. А.А. Вишневого» Минобороны России

³ООО «БИОСПЕК», Москва, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук», ИОФ РАН

⁵ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», кафедра лазерных микро-нано и биотехнологий №87

Лечение гнойных ран мягких тканей сопряжено с определенными трудностями, которые обусловлены многими факторами, в том числе особенностями возникновения, формирования и характером течения раневого процесса. Гнойные осложнения существенно удлинляют и удорожают лечебный процесс. Особое место занимают инфекционные осложнения огнестрельных ран, раневой канал которой имеет сложную форму, неравномерную протяженность, а также зоны некротических изменений. Нами предлагается способ решения проблемы инактивации антибиотикорезистентной микрофлоры с использованием технологии, основанной на флуоресцентной диагностике и фотодинамической терапии. В работе исследовалось влияние параметров облучения и способа аппликации фотосенсибилизатора на фотодинамическую инактивацию (ФДИ) микрофлоры раневой поверхности.

Ключевые слова — гнойные раны; антибиотикорезистентная микрофлора; фотодинамическая терапия; фотодинамическая инактивация.

I. ВВЕДЕНИЕ

Цель. Оценить возможность применения фототераностики для лечения огнестрельных ранений в условиях инфицирования антибиотикорезистентной микрофлорой

Материалы и методы. Способ введения фотосенсибилизатора местный. Проводилась ирригация водного раствора фотосенсибилизатора, а также его нано формы, через стандартные распылительные устройства.

Для глубоких ран использовались оптические волокна с цилиндрическими диффузорами на дистальном конце длиной 25 мм, а для небольших поверхностных ран - торцевые волокна с микролинзой на дистальном конце. Процесс облучения осуществлялся посредством лазерной установки ЛФТ-02-«Биоспек» с длиной волны 670 нм. Для лечения неглубоких обширных ран использовался светодиодный облучатель, обеспечивающий плотности мощности на поверхности 300-400 мВ/см² с длиной волны

670-680 нм (разработан в НИЯУ МИФИ, изготовлен в ООО «Биоспек»). Флуоресцентная диагностика для точного определения концентрации препарата на поверхности и приповерхностных слоёв раны и окружающих тканей, на разных этапах лечебного процесса, проводилась с помощью лазерной электронно-спектральной оценки, а также видеофлуоресцентным методом.

Результаты. Методика применена для лечения гнойных ран у 90 пациентов с огнестрельными ранениями мягких тканей. Перед облучением и после ФДИ анализировался состав микрофлоры и её количество. Из полученных данных следует, что технология ФДИ с местным применением нано формы Фотосенса®, Метиленового синего® и производных Хлорина еб инактивируют как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. Использование нано форм всех применяемых фотосенсибилизаторов, в сравнении с водным раствором, позволило получить инактивацию микрофлоры у всех больных и уменьшить сроки заживления ран.

Вывод. Метод фотодинамической терапии с персонализированным флуоресцентным контролем, применяемый в лечении огнестрельных антибиотикорезистентных гнойных ран, показал высокую антимикробную активность в большинстве клинических случаев. Инактивация микрофлоры позволила выполнить отсроченные реконструктивно-пластические операции по закрытию дефектов мягких тканей и уменьшить сроки госпитализации раненных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Flemming. Hans-Curt. et al. "Biofilms: an emergent form of bacterial life." *Nature Reviews Microbiology* 14.9 (2016): 563-575.
- [2] Hamblin. Michael R. *Photons for Therapy: Targeted Photodynamic Therapy for Infected and Contaminated Wounds.* RTO-MP-HFM-109: 1-14, 2004.

Автофлуоресцентный метаболический профиль лимфоцитов как потенциальный предиктор эффективности иммунотерапии

Д.В. Южакова¹, А.В. Изосимова¹, М.М. Сажина¹, Д.А. Сачкова^{1,2}, И.С. Шумская³, К.С. Яшин¹, А.М. Можеров¹, В.И. Щеславский¹, М.В. Ширманова¹

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

² ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

³ Нижегородский областной клинический онкологический диспансер, Нижний Новгород, Россия

Аннотация — Ключевая проблема иммунотерапии опухолей связана с отсутствием надежных биомаркеров для предсказания чувствительности конкретного пациента к лечению. Мы показали возможности метаболического имиджинга иммунных клеток как для мониторинга раннего ответа на чекпойнт терапию в ходе лечения, так и для прогнозирования ответа на чекпойнт терапию для индивидуальных пациентов до начала лечения.

Ключевые слова — иммунотерапия; FLIM; меланома.

I. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время чекпойнт иммунотерапия занимает ведущую позицию в лечении меланомы и некоторых других опухолей, однако вызывает устойчивый ответ лишь у части пациентов [1]. В эпоху персонализированной медицины необходимы надежные биомаркеры для точного предсказания эффективности чекпойнт терапии индивидуальным пациентам. Таким предиктором может стать автофлуоресцентный профиль метаболических коферментов в циркулирующих Т-клетках, оцененный с помощью флуоресцентной времяразрешенной микроскопии (FLIM).

II. РАЗДЕЛ I

На первом этапе осуществлялась оптимизация подхода на модели мышинной меланомы B16F0. Автофлуоресценцию метаболического кофермента никотинамидадениндинуклеотида (фосфата) (НАД(Ф)Н) визуализировали с помощью флуоресцентного конфокального микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) с FLIM-модулем TCSPEC (Becker & Hickl GmbH, Германия). Анализ экспрессии маркеров активации и пролиферации проводили с помощью сортера BD FACSAria III (США).

Были продемонстрированы возможности FLIM иммунных клеток для мониторинга ответа на чекпойнт иммунотерапию на ранних этапах лечения путем визуализации свежих срезов лимфоузлов мышей. Более того, была разработана оригинальная *in vitro* клеточная модель на основе выделенных лимфоцитов мышей для

прогнозирования ответа на чекпойнт терапию до ещё начала лечения.

На втором же этапе проводилась валидация на материале от пациентов с опухолями различных нозологий. Установлено, что базовый автофлуоресцентный метаболический статус лимфоцитов из крови пациентов с меланомой может показать предрасположенность пациента к положительному либо отрицательному ответу на иммунотерапию. Так, более высокий относительный вклад свободной фракции НАДН $\alpha 1$, ассоциированное со сдвигом в сторону гликолиза для поддержания цитотоксических функций, удлинённое время жизни связанной компоненты НАДН $\tau 2$, ассоциированной с увеличением общего пула молекул НАД(Ф)Н в клетке в связи повышенной метаболической активностью, и появление в значительной части клеток вклада фосфорилированной формы НАДФН $\alpha 3$, связанной с усилением пролиферации и биосинтеза, наблюдались у пациентов, которые впоследствии демонстрировали частичный ответ на терапию пембролизумабом. Напротив, более низкие значения $\alpha 1$ и $\tau 2$, а также малое число либо отсутствие клеток с $\alpha 3$ наблюдались у пациентов с прогрессированием опухоли в ходе последующего лечения.

Кроме того, была проведена апробация пациент-специфической *in vitro* модели на основе выделенных лимфоцитов пациентов и фрагментов опухолевой ткани как на материале от пациентов с меланомой, так и на материале от пациентов с другой агрессивной опухолью - глиобластомой, новой потенциальной мишенью для иммунотерапии. Данная система демонстрировала гетерогенный ответ на добавление анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 антитела как среди отдельных пациентов, так и среди разных видов лечения. Основными биомаркерами ответа также выступали значения $\alpha 1$ и $\tau 2$. Дальнейшая разработка данного в будущем может способствовать развитию персонализированного лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] S.A. Kovács, J.T. Fekete and B. Györfy, "Predictive biomarkers of immunotherapy response with pharmacological applications in solid tumors," Acta Pharmacol Sin, vol. 44, pp. 1879–1889, April 2023.

Иммунофлуоресцентная микроскопия мазков крови для диагностики нарушений тромбоцитов

Е.В. Юшкова¹, Н.А. Подоплелова^{1,2}, Д.В. Федорова¹, А.Л. Хорева¹, А.Ю. Щербина¹, П.А. Жарков¹, М.А. Пантелеев^{1,2}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва, Россия

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва, Россия

Аннотация — Новый метод диагностики заболеваний тромбоцитов, основанный на иммунофлуоресцентном окрашивании мазков крови позволяет проводить дистанционную диагностику наследственных тромбоцитопатий. В данной статье описывается опыт внедрения этого метода в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия).

Ключевые слова — тромбоцитопения; тромбоциты; нарушения тромбоцитов; иммунофлуоресценция

I. ВВЕДЕНИЕ

Для наследственных нарушений тромбоцитов характерны разнообразные дефекты цитоскелета, гранул, сигнальных путей и поверхностных рецепторов. Эта группа заболеваний труднодиагностируема, и пациенты часто не получают правильный диагноз. Иммунофлуоресцентная микроскопия мазков крови позволяет выявить ряд наследственных тромбоцитопатий [1].

Возможность доставки мазков крови из других городов позволяет дистанционно диагностировать пациентов в специализированных центрах.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациентов и здоровых добровольцев набирали ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Диагнозы были подтверждены генетическим тестированием и/или проточной цитометрией. Кровь была взята в вакуумные пробирки с цитратом натрия. Мазки крови от здоровых доноров и пациентов были высушены на воздухе и зафиксированы в ледяном ацетоне (-20°C) в течение 2 минут. Для иммунофлуоресцентного мечения использовали первичные антитела к поверхностным маркерам (Ib/IX CD42, IIb/IIIa CD41, CD34), цитоскелету (миозин, β 1-тубулин, филамин 1), α -гранулам (CD62P, VWF), плотным гранулам и лизосомам (LAMP1, LAMP2, CD63) и вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 647. Мазки

крови оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии параллельно с нормальным контрольным образцом.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ

На основе литературы была подобрана диагностическая панель антител. Были подобраны оптимальные условия для исследования. Среди проанализированных пациентов были выявлены с дефектом цитоскелета — MYH9 (10 пациентов), TUBB1 (2 пациента), синдром Вискотта-Олдрича (26 пациентов), пациенты с дефектом поверхностных гликопротеинов — синдром Бернара-Сулье (9 пациентов), тромбастенией Гланцмана (11 пациентов), пациенты с дефицитом гранул — синдром Германского-Пудлака (3 пациента), синдром Якобсена (2 пациента), синдром серых тромбоцитов (3 пациента), GATA1 (1 пациент), пациенты с повышением CD34 — GF11b (2 пациента), RUNX1 (5 пациентов). Наблюдаемые изменения морфологии совпадают с литературными данными и позволяют поставить диагноз. Для пациентов с MYH9 — ассоциированной макротромбоцитопенией характерны гигантские тромбоциты и агрегаты тяжелой цепи немышечного миозина II-A в гранулоцитах. У пациентов с TUBB1 наблюдаются увеличенные тромбоциты с неправильным распределением β 1-тубулина в виде клубка ниток. При синдроме Вискотта-Олдрича повышена доля деформированных тромбоцитов. При синдроме Бернара-Сулье гигантские тромбоциты со сниженной экспрессией гликопротеина Ib/IX. Тромбоциты пациентов тромбастенией Гланцмана имеют сниженную экспрессию гликопротеина IIb/IIIa. При мутации в гене RUNX1 увеличенные тромбоциты с повышенной экспрессией CD34 и снижением α - и плотных гранул. При мутации GF11b увеличенные тромбоциты с повышенной экспрессией CD34 и снижением α -гранул.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Опыт использования иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови для диагностики наследственных тромбоцитопатий // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2023. – Т. 22. – №. 3. – С. 43-47.

Применение методов оптического биоимиджинга в хирургии опухолей головного мозга

К.С. Яшин¹, Е.Б. Киселева¹, К.А. Ачкасова¹, Д.С. Сачкова^{1,2}, А.С. Гришин¹, М.В. Ширманова¹, В.Ю. Щеславский¹, Н.Д. Гладкова¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

Астроцитомы являются наиболее распространенными опухолями головного мозга. Несмотря на значительный прогресс в современной нейроонкологии, результаты лечения пациентов остаются неудовлетворительными. Основной этап комбинированного лечения глиом — микрохирургическое удаление опухоли, при этом объем резекции опухоли достоверно коррелирует с продолжительностью жизни пациентов. Одним из ограничений радикальности удаления глиом является сложность определения границ опухоли вследствие ее инфильтративного роста. Так как традиционное удаление опухоли в белом свете микроскопа позволяет достичь максимальной резекции лишь в 23–50% случаев, предложен ряд методов интраоперационной диагностики для уточнения границ опухоли, среди которых наиболее эффективными признаны интраоперационная МРТ и флуоресцентная диагностика. Однако существуют ограничения для использования данных методов.

В настоящее время активно разрабатываются методы «оптической биопсии» ткани, позволяющие определить ее тип, морфологические и биологические особенности без ее удаления и проведения стандартного патоморфологического исследования. Методы оптического биоимиджинга имеют ряд преимуществ: высокая разрешающая способность, высокая скорость, возможность бесконтактного и неинвазивного исследования, в большинстве случаев отсутствие необходимости применения дополнительных контрастных веществ. В хирургии астроцитом головного мозга к наиболее перспективным методам относят конфокальную микроскопию, Рамановскую спектроскопию, оптическую когерентную томографию (ОКТ), флуоресцентный время-разрешенный имиджинг (FLIM). Широкий интерес данные методы вызывают не только среди нейрохирургов, но также и среди патоморфологов, в первую очередь для проведения

экспресс-биопсии интраоперационных образцов. Учитывая отсутствие необходимости удаления образца ткани, оптические методы могут использоваться в хирургии глиом головного мозга несколько шире, чем интраоперационное гистологическое исследование: (1) прямая интраоперационная визуализация, обеспечивающая обратную связь с хирургом в реальном времени, например, уточнение границы опухоли; (2) как обычное гистопатологическое исследование — исследование образцов для быстрого определения типа ткани; (3) для проведения экспресс-биопсии во время стереотаксических процедур. Более того, оптические методы позволяют расширить информацию о биологических свойствах ткани, как, например, FLIM дает уникальную возможность оценить метаболизм опухоли и перитуморальной области. ОКТ продемонстрировала возможность проведения интраоперационной оценки микроструктуры миелина и степени его разрушения в перитуморальной области. Применение данных методов в клинике может быть реализовано несколькими способами: 1) как специальный модуль операционного микроскопа; 2) в виде отдельного зонда для интраоперационного применения; 3) в виде системы для проведения исследований вне операционного поля.

В заключении стоит отметить, что стремительное развитие методов оптического биоимиджинга в области хирургии астроцитом головного мозга позволяет предположить закрепление за ними прочной ниши как методов, позволяющих существенно расширить возможности существующих методов интраоперационной нейровизуализации.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-75-10068.