

На правах рукописи



Маклыгина Юлия Сергеевна

**Разработка спектрально-флуоресцентных методов
диагностики и терапии глубокозалегающих опухолей
мозга**

Специальность: 01.04.21 – Лазерная физика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва-2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук

Научный руководитель: **Лощенов Виктор Борисович**,
доктор физ.-мат. наук, профессор, заведующий
лабораторией лазерной биоспектроскопии ЦЕНИ
ИОФ РАН

Официальные оппоненты: **Генина Элина Алексеевна**
доктор физико-математических наук, профессор
кафедры оптики и биофотоники, Саратовский
национальный исследовательский
государственный университет имени
Н.Г. Чернышевского

Доленко Татьяна Альдефонсовна
кандидат физико-математических наук, ведущий
научный сотрудник кафедры квантовой
электроники, Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Физический институт имени
П.Н. Лебедева Российской академии наук

Защита диссертации состоится 7 октября 2019 г. на заседании Диссертационного
совета Д002.063.03 при Институте общей физики им. А.М. Прохорова РАН по
адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д.38, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОФ РАН.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 002.063.03
кандидат физико-математических наук
тел. +7(499) 503-87-77 доб. 1-47



Воляк Т.Б.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

По данным Всемирной организации здравоохранения смертность от опухолей мозга составляет около 3% от общей смертности по причине злокачественных новообразований. Статистика нейроонкологических заболеваний свидетельствует о наибольшей распространенности 40–45% низкодифференцированных глиом. Наиболее агрессивная из них характеризуется быстрым неконтролируемым ростом, высокой степенью инвазии и частотой рецидивирования, а также отсутствием четких диагностических критериев динамики патологического процесса. Особенности протекания опухолевого процесса данного генеза обуславливают среднюю выживаемость пациентов, которая составляет около года с момента постановки диагноза.

В настоящее время общим принципом лечения больных с глиальными опухолями головного мозга является комплексный подход, включающий хирургическое лечение, лучевую и химиотерапию. Другие методы, такие как иммунокорректирующая терапия и разрабатываемая в некоторых клиниках специфическая противоопухолевая иммунотерапия, не являются стандартом и находятся на стадии клинических исследований. Несмотря на совершенствование методик хирургического вмешательства и повышение технической оснащенности клинических подразделений, выполняющих послеоперационные лучевую и химиотерапии, в последнее время не удается значимо улучшить результаты комбинированного лечения злокачественных глиом. Медиана выживания пациентов с мультиформной глиобластомой не преодолевает порог в 14 мес.

Высокая летальность обусловлена множеством факторов, одним из которых является глубокая инвазивность мультиформной глиобластомы. В связи с характерным инфильтративным ростом данного типа опухоли ключевым недостатком хирургического вмешательства является отсутствие возможности тотального удаления глубоко залегающих опухолей (ГЗО), что является одной из основных причин рецидива заболевания.

В клинической практике нашли применение имплантаты, которые устанавливают в ложе опухоли после ее резекции [1]. Терапия основана на пролонгированном действии химиотерапевтического препарата, который постепенно высвобождается из имплантата. Таким образом, становится возможной деструкция опухолевых клеток, оставшихся после хирургического

вмешательства. Этот вид терапии опухолей головного мозга является максимально эффективным из ныне существующих, однако некоторые типы глиом являются устойчивыми к химио- и радиотерапии, что не позволяет данному методу быть универсальным.

Злокачественные глиомы головного мозга известны тем, что вторгаются и распространяются вдоль каналов белого вещества и вдоль кровеносных сосудов. Особую сложность представляет определение границ первичных внутримозговых опухолей, что обусловлено особенностями их инфильтративного роста вдоль нервных волокон и сосудов. Недавние исследования группы американских ученых показали, что клетки глиомы С6 массово мигрируют направленно вдоль полимерных нановолокон, покрытых питательной средой [2]. Кроме того, ученым удалось значительно снизить внутричерепной объем опухоли за счет имплантации волоконных структур внутрь черепной коробки и внешнего воздействия химиопрепарата на основе циклоаминового геля.

На основании полученных данных представляется перспективным создание таких условий, когда резидуальные клетки опухоли будут пролиферировать не центробежно (от центра к периферии), а центростремительно. В качестве такой системы, задающей направление роста опухоли, перспективными являются оптические волокна, структурно имитирующие каналы белого вещества и кровеносные сосуды. Обнаружение патологических тканей и их деструкция становятся наиболее эффективными за счет оптоволоконной внутренней структуры имплантата. Методы оптической спектроскопии для анализа состояния и функций тканей мозга в области имплантации обладают значительными преимуществами: высокая скорость обработки информации, оценка широкого спектра физиологических и морфологических параметров. Используемые оптические методы позволяют установить однозначное соответствие быстрых функциональных изменений в тканях и регистрируемого сигнала: поглощения, флуоресценции или различных видов рассеяния, обусловленных как веществами, изначально присущими нервным тканям и клеткам, так и контрастирующими маркерами, вводимыми извне [3].

Наиболее широко используемыми для анализа состояния тканей мозга эндогенными флуорофорами являются коферменты никотинамидадениндинуклеатид (NAD (NADH)) и коферменты флавины (FAD) [4]. NAD (NADH) — клеточный мембрано-связанный мультимолекулярный ферментный комплекс, локализующийся на плазматической мембране и в

некоторых органеллах, задействован главным образом в окислительно-восстановительных реакциях. Особенно обогащены этим ферментом опухолевые клетки, что связано с повышенным уровнем гликолиза. В свою очередь флавинадениндинуклеотид (FAD) — кофермент, принимающий участие во многих окислительно-восстановительных биохимических процессах, которым обогащены фагоцитарные клетки, такие как макрофаги. Кроме того, уже доказана способность макрофагов изменять свой фенотип в зависимости от микроокружения и тем самым влиять на развитие опухолевого процесса, что делает задачу распознавания клеточного состава стромы опухоли перспективной в целях разработки новых персонализированных подходов к диагностике и терапии онкологических заболеваний [5].

Одной из стратегий идентификации опухолевых клеток и опухоль-ассоциированных макрофагов (ТАМ) в тканях является использование эндогенной флуоресценции метаболитических кофакторов NADH и FAD с количественным их определением с помощью флуоресцентной время-разрешенной лазерной микроскопии (FLIM).

Однако для прицельного эффективного фототерапевтического воздействия необходимым условием является введение экзогенных флуорофоров [6]. Флуоресцентные маркеры, чувствительные к различным процессам, происходящим в тканях мозга на клеточном уровне, а также высокоспецифичные методы их доставки позволяют проводить анализ метаболизма и функциональной активности клеток мозга. Немало преимуществ имеют оптические методы и в терапии различных нарушений мозга благодаря возможности селективного воздействия на патологически измененные ткани, содержащие контрастирующее вещество, чувствительное к определенным длинам волн. В результате воздействие лазерного излучения способно вызвать клеточную гибель за счет фотохимических, фототермических и фотобиологических реакций в тканях. Способность клеток различной морфологии по-разному накапливать фотосенсибилизаторы (ФС) (а именно опухоль-ассоциированные макрофаги способны накапливать фотосенсибилизаторы до 9 раз больше, чем опухолевые клетки [7]), связана с различиями в наборе эффекторных молекул, метаболизме и фагоцитозе. Поэтому оптические методы позволяют осуществлять клеточную дифференциацию и дезактивацию с помощью воздействия излучения в полосу поглощения фотосенсибилизатора эндогенной и экзогенной природы.

Кроме того, использование нанокompозитов, флуоресцирующих и обладающих фототоксическим действием в дальней красной и ближней

инфракрасной области спектра, открывает новые возможности для диагностики и терапии глубокозалегающих опухолей (ГЗО). Однако обширное метастазирование глиом вглубь мягкой мозговой ткани серьезно осложняет возможность тотальной деструкции метастатических очагов на значительном удалении от первичной опухоли при помощи лазерного излучения, что обусловлено эффектом его поглощения биотканью [8]. В этой связи использование излучения Вавилова–Черенкова, возникающего в тканях с повышенной тропностью к радиофармпрепаратам (РФП), в качестве источника возбуждения фотосенсибилизатора «изнутри» является перспективной задачей для реализации комплексного подхода к терапии опухолей головного мозга [9].

Таким образом, перспективным является многосторонний подход к решению проблемы диагностики, лечения и профилактики ГЗО, а именно:

1. Использование системы, направляющей рост рецидивных клеток глиомы, возникающих в области удаленной опухоли, вдоль волокон по направлению к проксимальной части волоконно-оптического имплантата (нейропорт) с целью их регистрации по сигналу фотолюминесценции.

2. Использование фотосенсибилизаторов ближнего инфракрасного диапазона, в том числе в нано-форме, для увеличения глубины диагностики и фотодинамической терапии.

3. Использование время-разрешенной спектроскопии для идентификации клеточного состава в области зондирования и прогнозирования развития опухолевого процесса.

4. Использование излучения Вавилова–Черенкова для оказания терапевтического воздействия «изнутри», позволяющего в режиме неинвазивного мониторинга осуществлять контроль и профилактику рецидивирования патологического процесса в том числе в глубоких зонах мозга.

Описанный многосторонний подход является предпосылкой для развития новых медицинских персонализированных методов и увеличения продолжительности жизни онкологических пациентов.

Целью данной работы являлась разработка спектрально-флуоресцентных методов оценки состояния опухолей мозга экспериментальных животных для создания новых медицинских технологий диагностики, терапии и профилактики глубокозалегающих опухолей мозга, в частности послеоперационного мониторинга состояния клеток в ложе опухоли.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие **задачи**.

1. Разработать волоконно-оптический нейрокомплекс для исследования состояния экспериментальных опухолей головного мозга с прицельной оценкой эффективности сбора флуоресцентного отклика из ГЗО, и из ложа опухоли, после хирургического удаления основного узла.
2. Исследовать клеточный состав опухолевой ткани, различающийся по фенотипу и степени активности иммунокомпетентных клеток (микроглии с различной степенью активации), с помощью время-разрешенной спектроскопии с прицельной оценкой времени жизни флуоресценции эндогенных и экзогенных флуорофоров в условиях *in vivo*.
3. Апробировать новые фотосенсибилизаторы, в том числе в наноформе, дальнего красного и ближнего инфракрасного диапазонов с прицельной оценкой глубины зондируемой области в биологических тканях.
4. Исследовать эффективность возбуждения фотосенсибилизатора АЛК-индуцированного протопорфирина IX с использованием излучения Вавилова–Черенкова, возникающего в опухолевых тканях при введении радиофармпрепарата (фтордезоксиглюкоза (ФДГ)).

Научная новизна

Результаты, изложенные в диссертационной работе, имеют фундаментальное и прикладное значение. Полученные данные могут быть использованы для создания новых подходов и методов многофункциональной волоконно-оптической визуализации глубоких зон мозга, а также для терапии ГЗО.

1. Предложен и реализован новый подход к диагностике и терапии ГЗО головного мозга на экспериментальных животных, заключающийся в применении волоконно-оптического нейропорта, который вживляется в ткань мозга и позволяет контролировать течение опухолевого процесса по спектрально-флуоресцентным характеристикам и, в случае необходимости, разрушать раковые клетки и ТАМ.
2. Исследованы спектрально-флуоресцентные свойства новых ИК-фотосенсибилизаторов бактериохлоринового ряда в молекулярной и наноформе. Обнаружено наличие чувствительности наночастиц к микроокружению, выражающееся в изменении их спектрально-флуоресцентных свойств.
3. Разработан и реализован новый подход к оценке состояния опухолевого процесса головного мозга по измерению динамики изменения времени жизни флуоресценции ферментов дыхательной цепи клеток и макрофагов головного мозга.

4. Предложен новый подход к лечению ГЗО методом фотодинамической терапии, но без использования внешнего источника света, который заключается в применении излучения Вавилова–Черенкова, возникающего при попадании в опухоль радиофармпрепарата (фтордезоксиглюкоза) совместно с фотосенсибилизатором (5-АЛК индуцированный протопорифирин IX), который выполняет роль акцептора излучения и обладает фотодинамическим эффектом.

Практическая значимость

1. Результаты работы по созданию нейропорта позволят как минимум продлить жизнь пациентам с глиобластомами мозга высокой степени злокачественности.
2. Результаты работы по использованию излучения Вавилова–Черенкова в качестве источника света для реализации фототерапии «изнутри» независимо от глубины залегания опухоли не только головного мозга, но и других труднодоступных опухолей создают предпосылки разработки новых медицинских технологий.
3. Результаты исследования клеточной идентификации фенотипа макрофагов методом время-разрешенной спектроскопии позволяют оценивать во времени эффективность лечения опухолей различной локализации и на базе этого создать новый класс приборов нового поколения.
4. Результаты исследования нового ИК ФС дают предпосылки для фототераностики опухолей большего размера и находящихся на большей глубине, чем при использовании ФС нынешнего поколения.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный нейропорт позволяет проводить мониторинг содержания флуорофоров и структурных изменений биотканей в ложе опухоли.
2. Время жизни флуоресценции ФС (5-АЛК индуцированный протопорифирин IX) в опухоль-ассоциированных макрофагах глиомы С6 изменяется при фотодинамическом воздействии ($\lambda_{ex} = 635$ нм, доза 300 Дж/см²), что свидетельствует о метаболических изменениях в опухоли.
3. Изначально фотонеактивные нанокристаллы ФС (фталоцианин алюминия, бактериохлорин) при взаимодействии с поверхностными молекулами гидроксипатита приобретают способность к флуоресценции (при возбуждении $\lambda_{ex} = 632.8$ нм и $\lambda_{ex} = 532$ нм соответственно), что позволяет ускорить процесс биоинтеграции имплантата путем локального фотодинамического воздействия.
4. Возбуждение ФС излучением Вавилова–Черенкова вызывает деструкцию раковых клеток глиомы С6 при последовательном внутривенном введении ФС

(5-АЛК индуцированный протопорфирин IX 10 мг/кг) и РФП (фтордезоксиглюкоза 5–10 мКи) с временным промежутком в 2 часа.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов обусловлена использованием современных методов экспериментального исследования и научного оборудования, которое верифицируется в соответствии с международными стандартами обеспечения единства измерений и единообразием средств измерений, а также сопоставлением полученных результатов с данными, опубликованными в ведущих научных российских и зарубежных журналах и выводами других исследователей.

Публикации и апробация работы

Материалы диссертации были доложены на 12 международных и всероссийских конференциях, в том числе: Advanced microscopy meeting “Super resolution in different dimensions”; SPIE ECBO; Laser Optics 2016; International Conference on Lasers; Applications and Technologies (LAT 2016); IV, V, VI Всероссийская конференция “Фотодинамическая терапия и фотодиагностика”; SPIE Optical systems design; International Conference on Laser Optics ICLO 2018 и др. По результатам конференций представлены 23 доклада, опубликованные в сборниках трудов. Основные результаты диссертации опубликованы в 13 печатных работах в журналах, входящих в перечень ВАК.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка основных публикаций по теме диссертации и списка цитируемой литературы. Общий объем диссертации 121 страница, включая 59 рисунков и список литературы из 94 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цель и задачи исследования, а также приведены научная и практическая значимость работы.

В **Главе 1** приведен обзор литературы по существующим методам анализа состояния и функций мозга. Особенное внимание уделено рассмотрению оптических свойств биологических тканей, в частности тканей мозга. Показана актуальность и перспективность лазерно-спектроскопических методов в исследованиях патологий мозга.

Глава 2 посвящена подробному рассмотрению материалов и методов исследования: описаны устройства и принцип работы оборудования, а также экспериментальные биологические модели, которые использовались в работе. Обоснован выбор методов и моделей исследования, описан ход экспериментальных работ.

Наряду с рассмотрением контрольных методик исследования (магнитно-резонансная томография (МРТ), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ)) особое внимание уделено методам оптической спектроскопии для анализа состояния и функций мозга, которые обладают значительными преимуществами перед другими методами, используемыми в нейрохирургии и нейроонкологии. Одним из основных преимуществ является высокая скорость обработки информации. Не менее важен и широкий спектр физиологических и морфологических параметров, доступных для анализа методами оптической спектроскопии.

Значительная корреляция структурных клеточных характеристик и регистрируемого сигнала — поглощения, флуоресценции или различных видов рассеяния веществ, изначально присущих нервным тканям и клеткам, или контрастирующих маркеров, вводимых извне, позволяет анализировать клеточный состав опухоли. Одной из стратегий оценки фенотипа клеток, составляющих опухолевую ткань, является использование эндогенной флуоресценции метаболических кофакторов NADH и FAD с количественным определением с помощью флуоресцентной время-разрешенной лазерной микроскопии (FLIM). Основной задачей является неинвазивная идентификация опухолевых и опухоль-ассоциированных клеток различного фенотипа в интактном микроокружении опухоли. В свою очередь, для прицельного эффективного фототерапевтического воздействия необходимым условием является введение экзогенных флуорофоров. Метаболические процессы, характерные для клеток с разным фенотипом, оказывают существенное влияние на время жизни флуоресценции экзогенных фотосенсибилизаторов, что делает их эффективными зондами для оценки клеточного состава зондируемой области методом время-разрешенной спектроскопии и микроскопии. Последние научные исследования доказывают особую роль опухоль-ассоциированных макрофагов в процессах распространения и метастазирования опухоли, что делает их перспективными мишенями для противоопухолевой терапии.

Еще одним важным вопросом, затронутым в данной главе, является создание экспериментальных моделей для исследования, повторяющих по своим свойствам биологическую ткань. Так, были рассмотрены фантомы

биологических тканей с оптическими свойствами, близкими к свойствам тканей *in vivo*; клеточные культуры крысиной опухоли мозга (глиомы С6) и моноциты человека. Завершающая стадия исследований была проведена на экспериментальных животных с индуцированной опухолью мозга, что позволило учесть также роль иммунной системы в канцерогенезе.

Глава 3 содержит описание процесса и результаты разработки системы для внутричерепной имплантации с целью терапии и предотвращения рецидивирования глиом головного мозга. Оптоволоконная система должна выполнять роль структуры, которая задает направление роста структурно-функциональных единиц нервной системы, а также играет роль порта для доставки препарата (фотосенсибилизатор в молекулярной и наноформах) и лазерного излучения для осуществления мониторинга процессов, проведения регулярной флуоресцентной диагностики (ФД) и своевременной фотодинамической терапии (ФДТ) зондируемой области. Основная функция разработанной системы состоит в том, чтобы направить рост клеток глиомы вдоль волокон по направлению к проксимальной части волоконно-оптического имплантата (нейропорт) и обнаружить их по сигналу фотолуминесценции, а также произвести деструкцию путем фотодинамического воздействия.

Разработанная оптоволоконная система имеет следующие составные части: внешний каркас, многофункциональную внутреннюю структуру, созданную на базе пористых оптических волокон, покрытых питательной средой, которая содержит наночастицы ФС. Ввиду многокомпонентности системы процесс разработки был поэтапным. На первом этапе разработаны и апробированы на экспериментальных животных конструкции имплантатов, изготовленные из различных материалов. Заранее спроектированные полые и с внутренней волоконной структурой имплантаты, которые выполняли роль порта для локальной доставки лазерного излучения, устанавливали внутри черепной коробки экспериментальных животных. В ходе исследования была оптимизирована конструкция имплантата, которая обеспечила наиболее выгодные условия для проведения флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии (рис. 1). Также был изучен процесс биоинтеграции имплантатов, изготовленных из наиболее перспективных биосовместимых материалов: гидроксипатита, сапфира и полимерных материалов. Процесс биоинтеграции имплантатов отслеживали с помощью МРТ. В результате серии экспериментов на лабораторных животных были выявлены оптимальная конструкция, размеры и природа материала для изготовления нейропорта с учетом возможности синхронизации с волоконно-оптическим анализатором

ЛЭСА-01-БИОСПЕК (рис.2): полимерные конструкции PLA $d = 3$ мм, $h = 5$ мм, реализованные при помощи 3D печати, что позволило с легкостью варьировать размеры имплантатов.

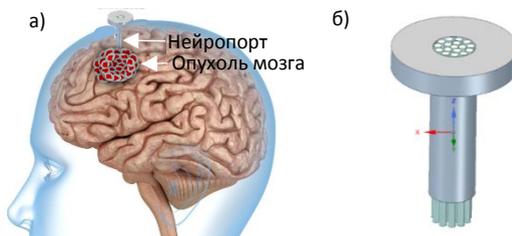


Рисунок 1. а) Схематическое изображение внутречерепной имплантации нейропорта. б) Оптимальная конструкция нейросистемы с внутренней оптоволоконной структурой.

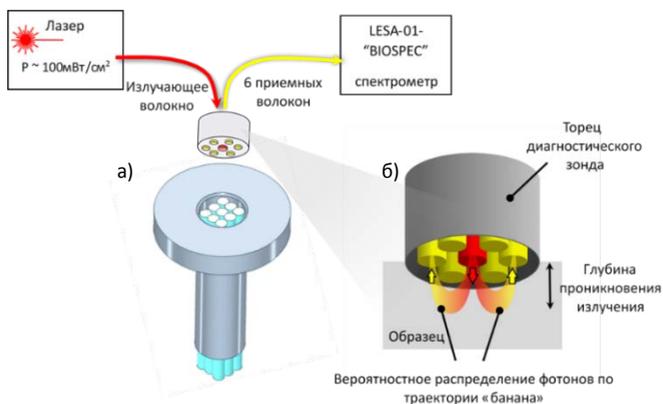


Рисунок 2. а) Конструкция разработанного нейропорта, б) схема экспериментального исследования оптических характеристик волоконной структуры имплантата и сенсibilизированной биологической ткани.

Следующим этапом стало детальное исследование внутренней волоконной структуры мозговых имплантатов. С применением лазерной сканирующей конфокальной микроскопии показаны процессы роста клеток злокачественной глиомы С6 по поверхности оптических волокон, покрытых питательной средой (источник аминокислот), которые являются внутренней многофункциональной частью имплантата. Исследования *in vitro* показали, что клетки злокачественной глиомы формируют агломераты на поверхности оптических волокон и распространяются непосредственно вдоль волоконных структур (рис.3). Полученные результаты дали основания полагать, что в

условиях *in vivo* может быть реализован подход направленного роста клеток злокачественной глиомы из внутрочерепной области вглубь разрабатываемого имплантата с последующим фотодинамическим воздействием, приводящим к гибели клеток.

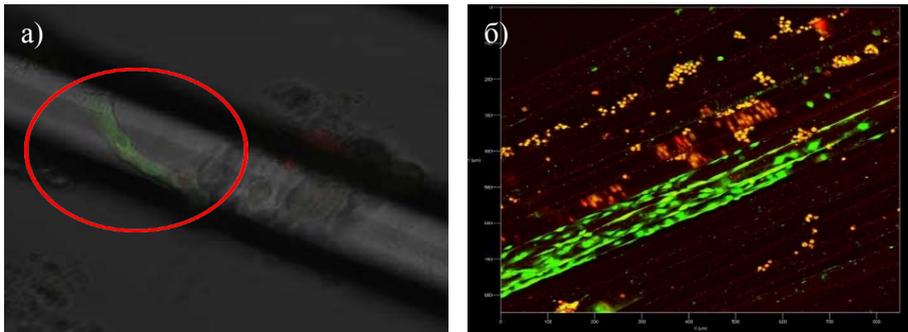


Рисунок 3. 3D-реконструкция флуоресцентных изображений роста вдоль оптического волокна: а – единичная клетка глиомы Сб (выделенная область); б – скопления клеток глиомы Сб, окрашенных акридиновым оранжевым (АО) (зеленый цвет – изображение живых клеток) и пропидий-йодидом (PI) (красный цвет – изображение погибших клеток)

Полимерные конструкции с внутренней оптоволоконной структурой имплантатов были апробированы на экспериментальных животных в условиях *in vivo*. Установленные в ложе опухоли имплантаты служили в качестве порта для локальной доставки диагностического и терапевтического лазерного излучения. Контроль состояния экспериментальных животных после имплантации производился с помощью флуоресцентной диагностики на основе фотосенсибилизатора безметалльного сульфированного фталоцианина при возбуждении излучением с $\lambda_{ex} = 632,8$ нм (рис.4б), а также с помощью МРТ (рис.4а). Было показано, что внутренняя волоконная структура способствует отслеживанию роста клеток вглубь нейропорта спектральными методами.

В ходе работы экспериментально установлена высокая чувствительность и эффективность спектральных методов для раннего обнаружения клеток глиомы в непосредственной близости к конструкции имплантата по флуоресцентному сигналу. В результате фотодинамической терапии (на примере безметалльного сульфированного фталоцианина, возбуждение излучением с $\lambda = 675$ нм) достигнут высокий терапевтический эффект (оценка по выживаемости в сравнении с контрольной группой) и обеспечен постоянный доступ в ложе опухоли для мониторинга состояния. Таким образом, разработано устройство, которое в совокупности с волоконно-

оптическим анализатором обеспечило мониторинг процессов, происходящих в зондируемой области, и контроль процессов рецидивирования (рис. 5).

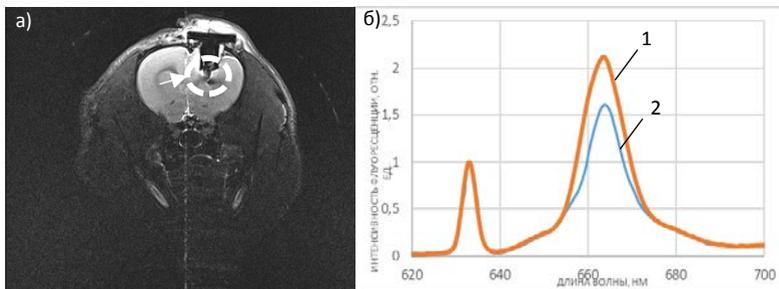


Рисунок 4. а) МРТ-снимок головного мозга крысы в режиме T2 на 5-е сутки после имплантации конструкции с внутренней оптоволоконной структурой, б) спектры флуоресценции, снятые с помощью имплантатов с (1) полый и (2) внутренней оптоволоконной структурой, характеризующие уровень накопления фотосенсибилизатора на основе безметалльного сульфированного соединения фталоцианина в опухоли ($\lambda_{ex}=632,8$ нм).



Рисунок 5. Схема экспериментальных исследований работы нейросистемы на лабораторных животных: (1) компьютер с программным обеспечением, (2) спектроанализатор, (3) лазерный источник.

В Главе 4 апробирован новый подход к оценке состояния тканей, различающихся по фенотипу и степени активности иммунокомпетентных клеток в ней, с применением фотосенсибилизаторов и время-разрешенных методов анализа их флуоресценции. Основное внимание уделено обнаружению различий между опухолевыми клетками и опухоль-ассоциированными макрофагами (TAM) спектроскопическими и микроскопическими методами по флуоресцентному сигналу коферментов NADH и FAD (которым обогащены макрофаги), а также по разнице в накоплении и флуоресцентном сигнале ФС

(накопление которого до 9 раз больше в макрофагах). Получены результаты исследования кинетики фотOLUMИнесценции коферментов NADH и FAD, а также фотосенсибилизатора с применением двух различных техник: время-разрешенной спектроскопии и время-разрешенной флуоресцентной микроскопии (FLIM).

Время-разрешенный спектроскопический анализ времени жизни флуоресценции ФС был проведен на половозрелых самках крыс с индуцированной опухолью головного мозга глиомой С6 в условиях *in vivo*. В качестве ФС в работе использовали 5-АЛК индуцированный протопорфирин IX (производство ГНЦ «НИОПИК»), которой широко применяется в клинической практике для эффективного проведения флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии. 5-АЛК вводили экспериментальным животным в хвостовую вену в дозе 10 мг/кг под общей анестезией. Контроль уровня накопления протопорфина IX в норме и в опухоли *in vivo* производился с помощью волоконного спектрометра (рис. 6а). В момент максимального накопления ($t = 3$ ч) произведено фотодинамическое воздействие лазерным излучением ($\lambda=650$ нм, доза 200 Дж/см²). Контроль времени жизни флуоресценции ФС до и после ФДТ (но при повторном введении препарата 5-АЛК) осуществлялся с помощью измерительного комплекса, который состоит из стрик-камеры с пикосекундным временным разрешением и волоконно-оптического спектрометра (рис. 6б).

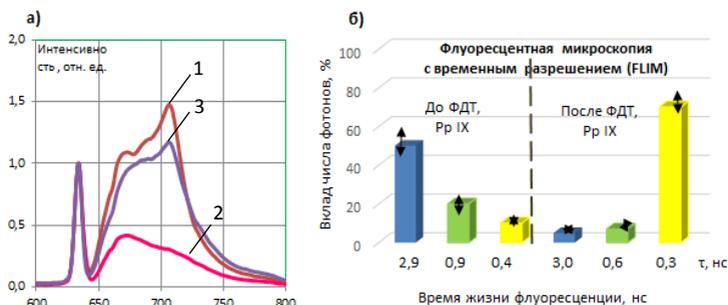


Рисунок 6. а) Спектры флуоресценции протопорфина IX в опухоли мозга крысы (глиома С6): (1) до ФДТ, (2) после ФДТ, (3) после ФДТ при повторном введении ФС. б) Гистограммы распределения вклада от различных компонент времени жизни флуоресценции протопорфина IX в опухоли мозга крысы.

В процессе измерения использовали метод время-коррелированного счета фотонов. Таким образом, получены результаты изменения кинетики люминесценции ФС (протопорифирин IX) в условиях *in vivo* на экспериментальных животных с индуцированной опухолью мозга глиомой С6. Было установлено наличие 3^х различных компонент, характерных для времени жизни флуоресценции ФС (протопорифирин IX), однако вклад (число фотонов флуоресценции) каждой компоненты сильно зависел от биологического микроокружения и от фенотипа клеток, с которыми флуорофор вступает во взаимодействие. Кроме того, было установлено, что в результате ФДТ и, как следствие, в результате изменения метаболических процессов внутри клеток происходит изменение вклада в кинетику флуоресценции различных временных компонент при том, что сами времена жизни флуоресценции не меняются (рис. 6б).

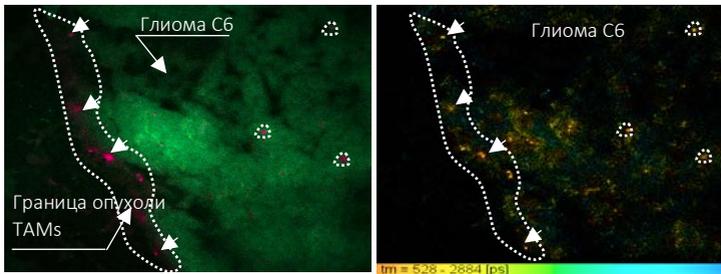


Рисунок 7. а) Флуоресцентное изображение центров накопления протопорифирин IX, полученное с криосрезов мозга крысы на границе опухолевой и нормальной ткани методом конфокальной микроскопии (20× увеличение). б) Изображение пространственного распределения времен жизни флуоресценции, полученное с криосрезов мозга крысы на границе опухолевой и нормальной ткани методом FLIM (20× увеличение).

На основании полученных результатов сделан вывод о наличии в опухоли составляющих, также активно накапливающих ФС, но при этом иначе взаимодействующих с ним. На роль таких агентов в первую очередь претендуют иммунокомпетентные клетки, а именно макрофаги, благодаря своей повышенной способности к накоплению ФС. Это предположение было проверено путем анализа криосрезов опухоли методом конфокальной и время-разрешенной флуоресцентной микроскопии (рис. 7а). В результате были обнаружены центры флуоресценции с временами жизни, совпадающими с полученными ранее в условиях *in vivo* (рис. 7б). Локализация и морфология клеток свидетельствовали об их иммунной природе. Близкое соседство с

опухолью дает основание считать их опухоль-ассоциированными макрофагами. Таким образом, оценка клеточного состава ткани в режиме неинвазивного мониторинга делает возможной селективную дезактивацию патологических клеток (в том числе иммунных), что значительно повышает эффективность противоопухолевой терапии. Особенную роль в подобных исследованиях может выполнять разработанный нейропорт. Комплексный подход при оценке состояния ложа опухоли с использованием многофункциональной нейросистемы позволит проводить анализ клеточного состава опухолевой ткани на значительной глубине в режиме постоянного мониторинга, что внесет значительный прогресс в эффективность терапии ГЗО.

Глава 5 посвящена апробации нового подхода к терапии ГЗО мозга. Несмотря на то, что разработанная нейрооптическая система обеспечивает постоянный доступ вглубь мозга, а именно в ложе опухоли, воздействие лазерного излучения (ФД и ФДТ) может распространяться на ткани, которые находятся в радиусе до 1–2 см, при условии использования ФС дальнего красного и ближнего ИК спектральных диапазонов. Фотосенсибилизаторы с длиной волны спектрального максимума в красном и ближнем инфракрасном диапазонах (740–1050 нм) обеспечивают наибольшую глубину проникновения излучения, поскольку собственное поглощение ткани в этом диапазоне минимально.

Наряду с направленным исследованием фотосенсибилизаторов с интенсивной полосой поглощения в дальней красной и ближней инфракрасной областях спектра были проведены исследования новых молекулярных нанокристаллов на основе органических молекул производных уже известных фотосенсибилизаторов. На примере фотосенсибилизатора – фталоцианина алюминия было показано, что в кристаллическом виде такие наночастицы водонерастворимы и нетоксичны, но при контакте с биоконпонентами, с опухолевыми или иммунными клетками, они меняют свои спектроскопические свойства: приобретают способность флуоресцировать, становятся фототоксичными. Таким образом, при использовании молекулярных нанокристаллов фотосенсибилизаторов реализован новый подход применения их в качестве регуляторов активности иммунокомпетентных клеток.

Однако глубокая инвазивность злокачественных глиом и обширное метастазирование вглубь мягкой мозговой ткани исключают возможность эффективной диагностики и тотальной деструкции метастатических очагов на значительном расстоянии от первичной опухоли при помощи лазерного излучения, что обусловлено эффектом его поглощения биотканью. В связи с этим был апробирован еще один подход, направленный на преодоление ограничений проникновения излучения в глубину ткани с применением

независимого источника излучения для возбуждения ФС — излучения Вавилова–Черенкова. Целью данного исследования стала оценка возможности терапии индуцированной опухоли мозга крысы путем возбуждения ФС альтернативным источником – излучением Вавилова–Черенкова, которое возникает вследствие позитронного бета-распада радионуклида, входящего в состав радиофармпрепаратов (РФП).

Для проведения исследования эффективности фотодинамической терапии, индуцированной излучением Вавилова–Черенкова, была проведена серия экспериментов на половозрелых самках крыс (массой в начале эксперимента 250 ± 10 г), у которых моделировали мультиформную глиабластому путем имплантации клеток глиомы крысы линии С6 в паховую область для простоты визуализации. В качестве ФС был использован 5-АЛК индуцированный протопорфирин IX (производство ГНЦ «НИОПИК»), который зарекомендовал себя в клинической практике для эффективного проведения флуоресцентной диагностики и ФДТ, в том числе благодаря высокой селективности локального накопления в раковых клетках. 5-АЛК вводили экспериментальным животным в хвостовую вену в дозе 10 мг/кг под общей анестезией. В качестве РФП в работе использовалось соединение 2-фтор-2-дезоксид-Д-глюкоза (ФДГ), которое является биологическим эквивалентом глюкозы: активно поглощается раковыми клетками. ПЭТ-исследование с применением этого препарата позволяет визуализировать патологические очаги: локализацию опухоли и наличие метастазов. Фтор-18 обладает оптимальными характеристиками для использования: наиболее удобным периодом полураспада ($T_{1/2} = 109,8$ мин) и наименьшей энергией излучения, т.е. позволяет получать ПЭТ-изображения высокой контрастности при низкой дозовой нагрузке на пациентов. Молекула ФДГ содержит радиоактивный (позитрон-излучающий) нуклид фтор-18, вследствие распада которого возникает излучение Вавилова–Черенкова, которое необходимо для возбуждения ФС. ФДГ вводилось животному в вену в момент максимального уровня накопления ФС в опухоли (в случае протопорфирина IX — через 3 часа после внутривенного введения 5-АЛК), доза препарата в растворе эквивалентна 5–10 мКи, после чего препарат распределяется по всему организму. Исследования ПЭТ с применением этого препарата позволили визуализировать патологические очаги: локализацию опухоли и наличие метастазов посредством анализа динамики биораспределения ФДГ (рис. 8а). Контроль уровня накопления протопорфирина IX в норме и в опухоли *in vivo* производился с помощью волоконного спектрометра ЛЭСА-01-Биоспек (рис. 8б).

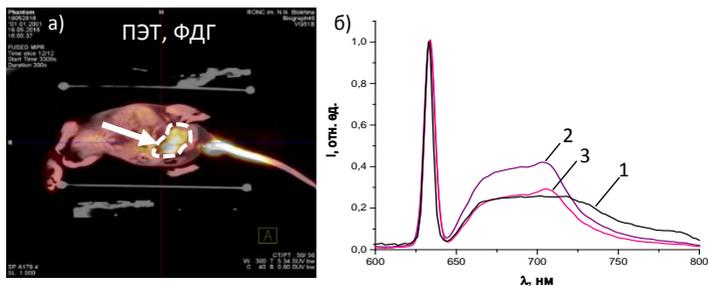


Рисунок 8. а) Биораспределение ФДГ *in vivo* через 60 мин после внутривенного введения. Изображение получено с помощью ПЭТ-сканера. б) Спектры флуоресценции ($\lambda_{ex}=632.8$ нм) препарата протопорфирина IX (1) в мышце после внутривенного введения 5-АЛК; (2) в опухоли после внутривенного введения 5-АЛК, (3) в опухоли после последовательного внутривенного введения 5-АЛК и ФДГ.

Исследование фотодинамического эффекта, вызванного излучением Вавилова–Черенкова, было проведено методом конфокальной микроскопии через 3 суток после введения экспериментального препарата. Полученные образцы тканей опухоли глиомы С6 замораживали, после чего готовили криосрезы толщиной 20 мкм. Исследование криосрезов опухоли методом конфокальной микроскопии позволило провести флуоресцентный анализ и оценить жизнеспособность клеток глиомы С6 в различных образцах путем функционального окрашивания. Оценка жизнеспособности клеток проводилась путем анализа флуоресцентного сигнала после окрашивания акридиновым оранжевым (АО), что позволяло выявить долю жизнеспособных клеток, и йодидом пропидия (PI), что позволяло выявить долю мертвых клеток (АО/PI, MolecularProbes®) (рис.9). Таким образом, было показано, что высокая тропность ФС (5-АЛК индуцированного протопорфирина IX) и РФП (ФДГ) к опухоли при последовательном их внутривенном введении в организм обуславливает взаимодействие препаратов непосредственно в раковых клетках, индуцируя фотодинамический эффект и разрушение патологического очага. Результаты исследования показали эффективность использования излучения Вавилова–Черенкова для активации ФС протопорфирина IX, индуцированного 5-аминолевулиновой кислотой (5-АЛК), и наличие выраженного фотодинамического эффекта, доказанного путем гистологического анализа опухолевых криосрезов (рис.9). Таким образом, обнаруженное в ходе исследования фотоиндуцированное взаимодействие между ФС и РФП открывает перспективы проведения фотодинамической терапии метастазирующих и ГЗО мозга.

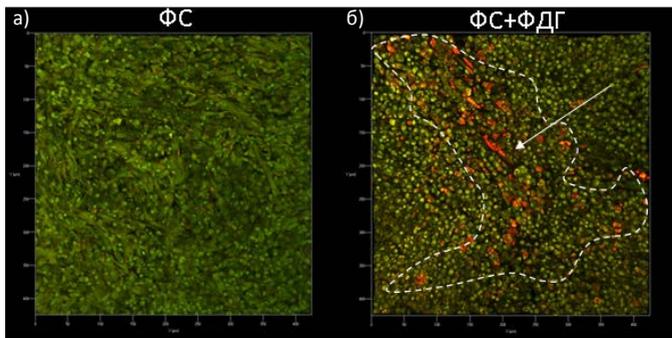


Рисунок 9. 3D-реконструкция флуоресцентных изображений криосрезов опухоли глиомы С6 окрашенных АО (зеленый цвет — изображение живых клеток) и PI (красный цвет — изображение погибших клеток), полученные от экспериментальных животных: а) в случае внутривенного введения 5-АЛК, б) в случае последовательного внутривенного введения 5-АЛК и ФДГ.

В **заключении** сформулированы основные результаты и выводы диссертационной работы. В ходе работы разработан и апробирован новый комплексный подход к проведению флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии глубокозалегающих и метастазирующих опухолей мозга.

1. Разработана уникальная оптоволоконная система с внутренней волоконной структурой, которая задает направление клеточного роста, а также выполняет роль порта для доставки препарата (ФС) и лазерного излучения вглубь ткани для проведения флуоресцентной диагностики и своевременной фотодинамической терапии глубоко залегающих опухолей мозга.

2. Реализован новый подход оценки клеточного состава опухоли с применением метода время-разрешенной лазерной флуоресцентной микроскопии, что позволило анализировать в том числе степень активности иммунокомпетентных клеток путем дифференцировки времени жизни флуоресценции эндогенных и экзогенных флуорофоров.

3. Получены спектрально-флуоресцентные свойства фотосенсибилизаторов дальней красной и ближней инфракрасной области спектра в их молекулярной и нано-формах в условиях *in vitro* и *in vivo*, что доказывает перспективность их использования для повышения эффективности флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии глубоко залегающих опухолей мозга.

4. Показана эффективность использования в качестве источника возбуждения фотосенсибилизатора излучения Вавилова–Черенкова — для

осуществления фотодинамического воздействия «изнутри» с целью снижения вероятности рецидивов опухолей мозга, в частности, путем воздействия на труднодоступные для лазерного излучения: метастатические очаги и отдельные единичные опухолевые клетки.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Maklygina Yu.S.**, Borodkin A.V., Loschenov V.B. Laser microscope-spectrum analyzer for studying intracellular accumulation of near infrared emitting photosensitizers in vitro. Biomedical photonics -2015.–N3.-P.3-9.
2. **Maklygina Yu.S.**, Sharova A.S., Kundu B., Balla V.K., Steiner R., Loschenov V.B. Spectral luminescent properties of bacteriochlorin and aluminum phthalocyanine nanoparticles as hydroxyapatite implant surface coating. Biomedical Photonics -2016. -V.5. -N2. -P. 4–12.
3. Sharova A. S., **Maklygina YU. S.**, Lisichkin G. V., Mingalev P. G., Loschenov V.B. Nanodiamonds + bacteriochlorin as an infrared photosensitizer for deep-lying tumor diagnostics and therapy. Journal of Physics: Conference Series -2016. -V.737.-N1.-P. 1-8.
4. **Maklygina Y.S.**, Borodkin A.V., Ryabova A.V., Pominova D.V., Makarova E.A., Lukyanets E.A., Loshchenov V.B. Study of subcellular distribution of crystalline meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanoparticles. Biomedical Photonics -2016.-V.5.-N4. -P.25-34.
5. Kholodtsova M.N., **Samsonova I.S. (Maklygina)**, Blondel W., Loschenov V.B. Metal nanoparticles of different shapes influence on optical properties of multilayered biological tissues. Progress in Biomedical Optics and Imaging – Proceedings of SPIE -2015. –V.9542. -N954205.
6. **Маклыгина Ю.С.**, Рябова А.В., Лощенов В.Б., Соколов Е.Н., Невзоров Д.И., Григорьева Е.Ю., Долгушин М.Б., Долгушин Б.И. Использование излучения Вавилова–Черенкова для деструкции клеток глиомы С6 крысы при сочетанном воздействии ФДГ и 5АЛК индуцированного протопорфирина IX. Пилотное экспериментальное исследование. Вестник РОНЦ –2016. - Т.27.-N4.-С. 133-139.
7. **Maklygina Yu. S.**, Borodkin A.V., Yusubalieva G. M., Ryabova A.V., Pominova D.V., Lukyanets E.A., Goryainov S. A., Potapov A. A., Chekhonin V.P., Shcherbakov I.A., Loshchenov V.B., The development of neoscaffold for the glioblastoma therapy. Biomedical Photonics - 2017.–V.6.–N4.-P.12-18.
8. **Maklygina Y.S.**, Sharova A.S., Kundu B., Balla V.K., Steiner R., Loschenov V.B. Photobactericidal Properties of Hydroxyapatite Implant Surface Coating. Bioceramics Development Applications -2016. –V.6. –N2. –P.1-6. doi: 10.4172/2090-5025.1000094.
9. Sharova A.S., **Maklygina Yu. S.**, Yusubalieva G.M., Shikunova I.A., Kurlov V.N., Loschenov V.B. Sapphire implant based neuro-complex for deep-lying brain tumors phototheranostics. Journal of Physics: Conference Series -2018.-V.945. -N1. -P.1-5.
10. Sharova A.S., **Maklygina Yu. S.**, Romanishkin I.D., Yusubalieva G.M., Ryabova A.V., Chekhonin V.P., Loschenov V.B. Optical fiber neurosystem for deep-lying brain tumors phototheranostics . Proc. SPIE 10695, Optical Instrument Science, Technology, and

Applications -2018. -V.1069500. doi: 10.1117/12.2312027.

11. **Maklygina Yu.S.**, Romanishkin I.D., Ryabova A.V., Yakavec I.V., Bolotin L., Loschenov V.B. A novel spheroid model for preclinical intercellular nanophotosensitizer-mediated tumor study. *Bulletin of RSMU* -2018. -V.6 -P.14–20. doi: 10.24075/brsmu.2018.079.

12. S. Sharova, **Y. S. Maklygina**, A. V. Ryabova and V. B. Loschenov, Spectral properties comparative analysis of normal and tumor brain tissues in the visible and near infrared optical ranges. 18th International Conference on Laser Optics (ICLO 2018) -2018. -P. 497-497. doi: 10.1109/LO.2018.8435632.

13. **Y. S. Maklygina**, G. M. Yusubalieva, I. D. Romanishkin, A. V. Ryabova, V. P. Chekhonin and V. B. Loschenov, TAM identification by fluorescence lifetime on different models // 18th International Conference on Laser Optics (ICLO 2018) -2018. P. 538-538. doi: 10.1109/LO.2018.8435696.

Цитируемая литература

1. Ashby L.S., Smith K.A., Stea B. Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review. *World J Surg Oncol* 2016; 14(1):225.
2. Jain A., Betancur M., Patel G.D., Valmikinathan C.M., Mukhatyar V.J., Vakharia A., Pai S.B., Brahma B., MacDonald T.J., Bellamkonda R.V.. Guiding intracortical brain tumour cells to an extracortical cytotoxic hydrogel using aligned polymeric nanofibers. *Nature Materials* 2014;13(3):308.
3. M.Loshchenov, P.Zelenkov, A.Potapov, S. Goryajnov, A. Borodkin. Endoscopic fluorescence visualization of 5-ALA photosensitized central nervous system tumors in the neural tissue transparency spectral range. *Photonics & Lasers in Medicine* 2014;3(2):159.
4. Conklin M.W., Provenzano P.P., Eliceiri K.W., Sullivan R., Keely P.J. Fluorescence lifetime imaging of endogenous fluorophores in histopathology sections reveal differences between normal and tumor epithelium in carcinoma in situ of the breast. *Cell Biochem Biophys* 2009;53(3):145.
5. Hambardzumyan D., Gutmann D.H., Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nature Neuroscience* 2016;19(1):20.
6. Muller P.J., Wilson B.C. Photodynamic therapy. *Neurooncology. The Essentials*. New York, 2000. Ch. 25. P. 249-256.
7. Korbely M, Krosz G. Br Photofrin accumulation in malignant and host cell populations of various tumours. *J Cancer* 1996;73(4):506-13.
8. Kotagiri N., Sudlow G.P., Akers W.J., Achilefu S. Breaking the depth dependency of phototherapy with Cerenkov radiation and low-radiance-responsive nanophotosensitizers. *Nature Nanotechnology* 2015;10(4):370.
9. S.M. Azarin, J. Yi, R.M. Gower, B.A. Aguado, M.E. Sullivan, A.G. Goodman, E.J. Jiang, S.S. Rao, Y. Ren, S.L. Tucker, V. Backman, J.S. Jeruss & L.D Shea. In vivo capture and label-free detection of early metastatic cells. *Nature Communications* 2015; 6(8094).