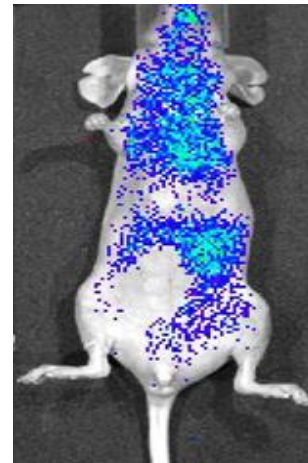
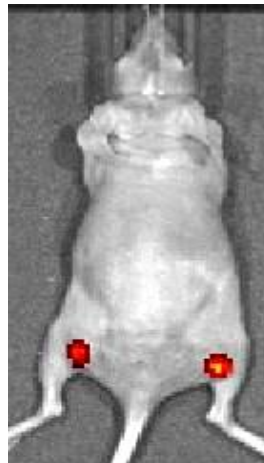
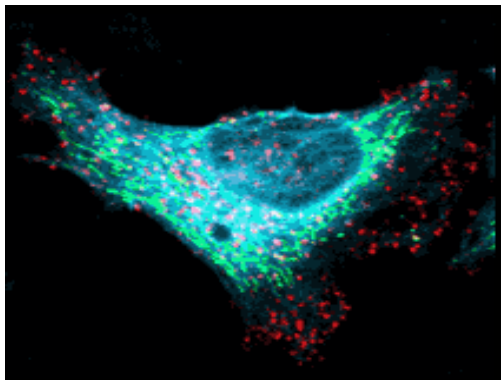


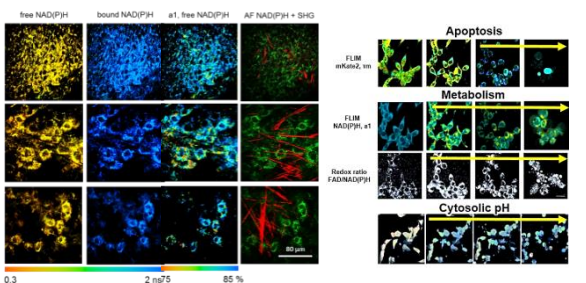
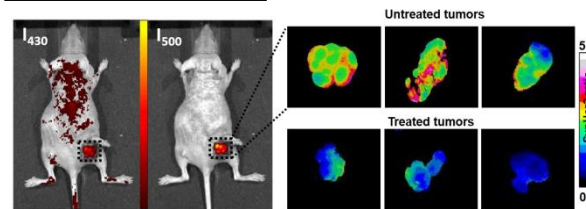
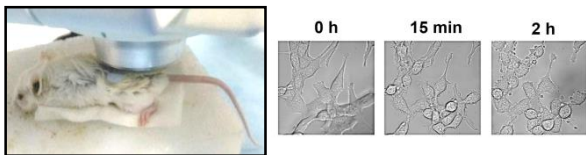
Новейшие технологии биоимиджинга для задач онкологии и регенеративной медицины

Загайнова Е.В.

НИИ Биомедицинских технологий

Приволжский исследовательский медицинский университет
Минздрава России





1. Фундаментальные исследования рака

1. Выполняются эксперименты на монослойных культурах, опухолевых сфероидах и моделях опухолей животных с применением методов **флуоресцентного имиджинга**, в т.ч. с временным разрешением.
2. Исследуются **механизмы ответа опухоли на лечение** на основе анализа цитоплазматического pH, клеточного метаболизма, вязкости мембраны, оксигенации, клеточного цикла, апоптоза, ультраструктуры цитоскелета.
5. Разработан метод **оценки химиочувствительности** опухолей **пациентов** на основе краткосрочных клеточных культур.

2. Оптические методы диагностики

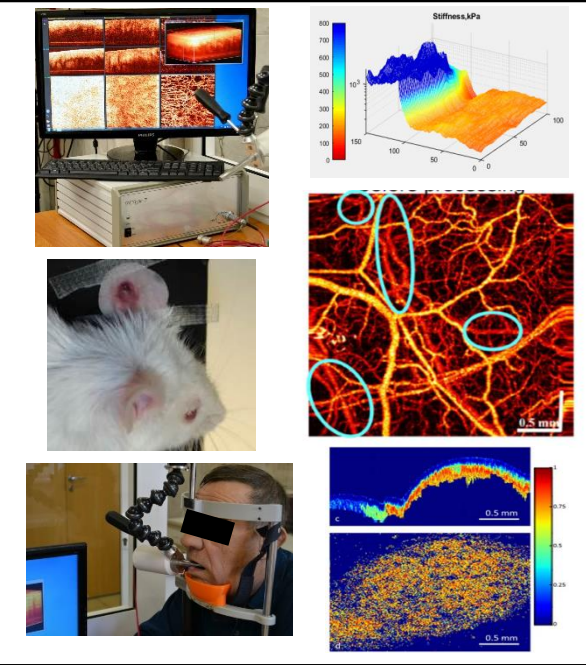
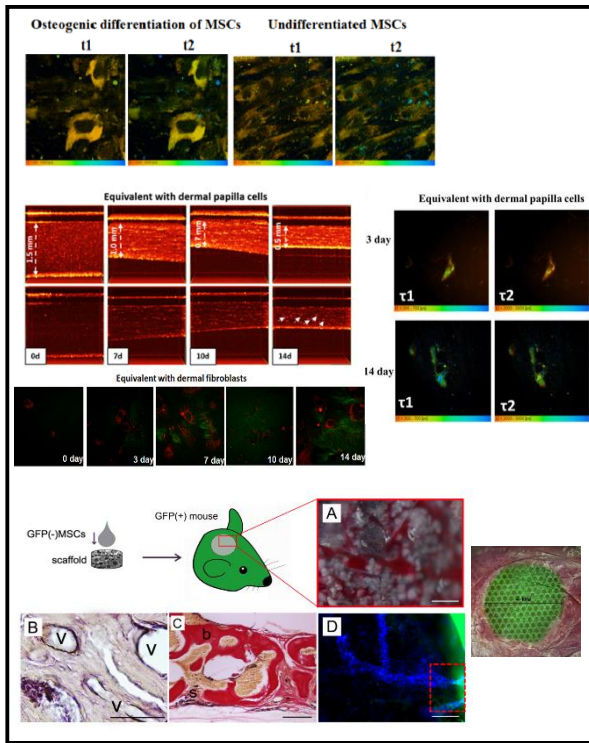
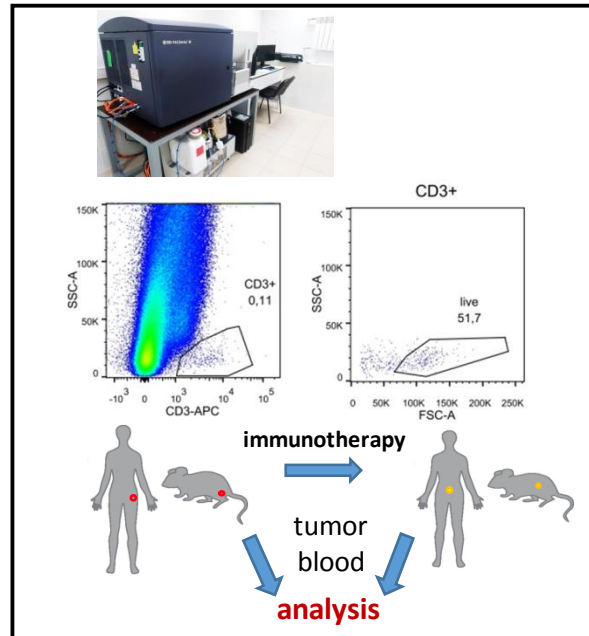
1. Разработан метод **мультимодальной** ОКТ: 3D, кросс-поляризационная, микроангиография, эластография
2. Показаны возможности в **предклинических** и **клинических** исследованиях: мониторинг эффективности ФДТ и ЛТ, определение негативного края резекции при глиомах, РМЖ.

3. Геномика адаптивного иммунитета

1. Создана лаборатория геномики адаптивного противоопухолевого иммунитета (рук. Д.М. Чудаков).
2. Проводится исследование **функциональных субпопуляций** опухолеинфильтрирующих Т-лимфоцитов.
3. Разрабатывается протокол индивидуального подбора **иммунотерапии** рака на основе геномного анализа Т-клеточных рецепторов в опухолях **пациентов**.

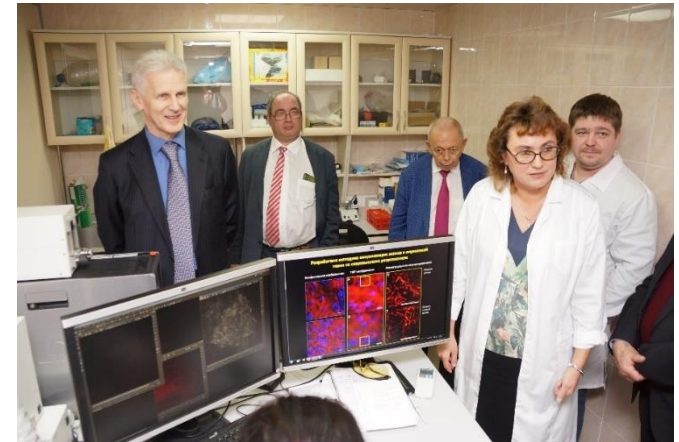
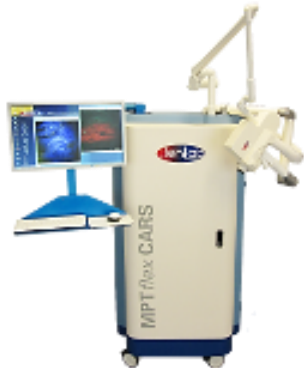
4. Регенеративная медицина

1. Продемонстрированы **функциональные изменения** (метаболизм, pH, вязкость и др.) стволовых клеток **при дифференцировках** с помощью методов флуоресцентного имиджинга.
2. Разработаны подходы к оценке структуры и качества **дермальных эквивалентов** на основе технологий оптического имиджинга без использования контрастов ("label-free": ОКТ, ГВГ, FLIM).
3. Показано участие **аллогенных МСК** в формировании костной ткани и сосудов при устранении костного дефекта. Разработан способ **in vivo** оценки биодegradации **скаффолда**.



Объекты

- Библиотечные линии опухолевых и стволовых клеток
 - монослойные культуры
 - опухолевые сфероиды
- Опухолевые модели у мышей
 - мышинные
 - человеческие
- Образцы опухолей пациентов
 - изолированная ткань
 - краткосрочная клеточная культура
- Клинические исследования новых технологий диагностики рака
- Стволовые клетки животных, человека, iPS.
- БМКП кожи, кости.



Методы исследований

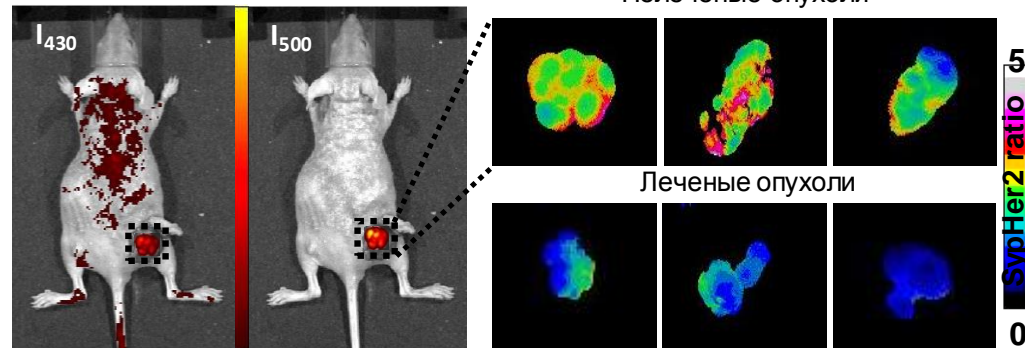
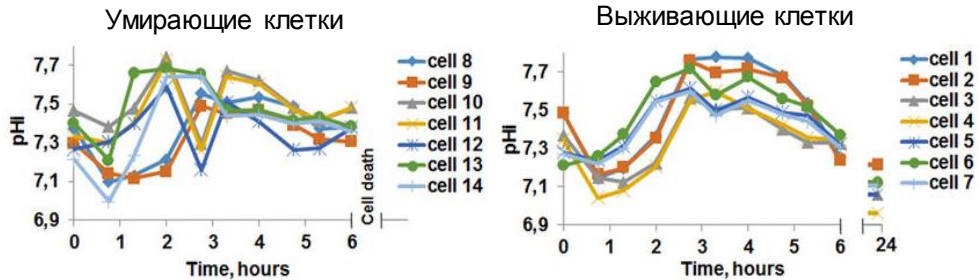
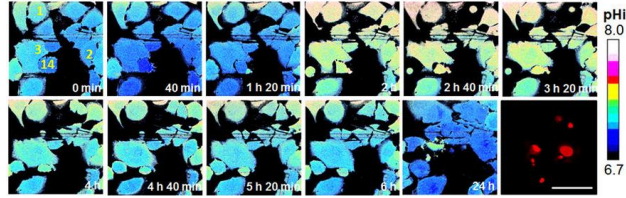
- Флуоресцентный имиджинг на уровне целого организма (установки IVIS-Spectrum, ИПФ РАН)
- Сверхразрешающая STORM-микроскопия
- Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (LSM 880)
- Мульти模альная оптическая когерентная томография (ИПФ РАН)
- Многофотонная томография (MPTflex), с 2014 г
- FLIM-микроскопия (Becker&Hickl) с 2014 г
- FLIM/PLIM-спектроскопия (Becker&Hickl), с 2015 г
- FLIM/PLIM-макроимиджинг (Becker&Hickl), с 2017 г
- Клеточный сортинг (BD FACS Aria III), с 2017 г
- Стандартная гистология, ИГХ
- Иммуноцитохимия

Экспериментальная онкология

Исследование (раннего) ответа опухолевых клеток на химиотерапию

Внутриклеточный pH

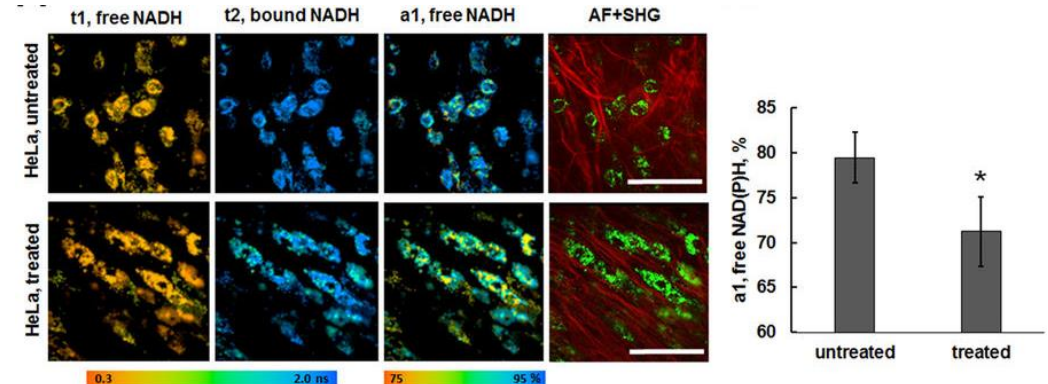
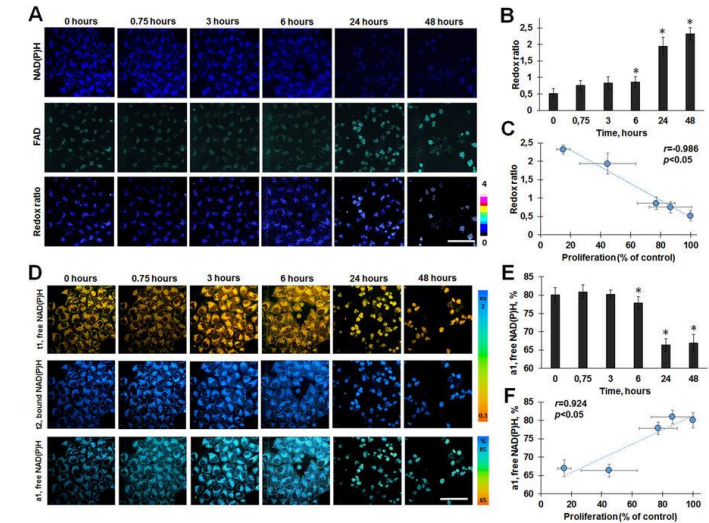
Генетически кодируемый сенсор SypHer2
Клеточная линия HeLa Kyoto,
препарат Цисплатин



- In vitro: способность клеток поддерживать слабощелочной pH способствует их выживанию .
- In vivo: закисление pH в опухолях, отвечающих на терапию (новый механизм действия цисплатина, связанный с ингибированием NHE1)

Энергетический метаболизм

Анализ флуоресценции метаболитических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД. Двухфотонная флуоресцентная микроскопия с временным разрешением (FLIM). Клеточная линия HeLa Kyoto. Препарат Цисплатин.



In vitro, in vivo: переключение метаболизма с гликолитического на окислительный. Ранняя метаболическая реакция на лечение.

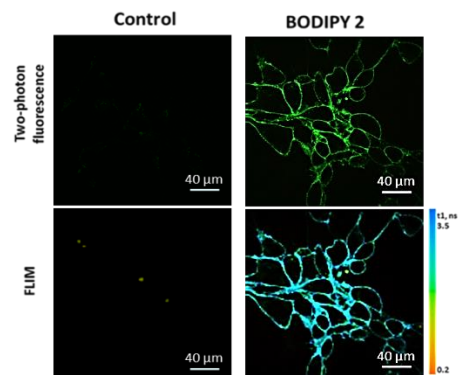
Исследование (раннего) ответа опухолевых клеток на химиотерапию

Вязкость цитоплазматической мембраны

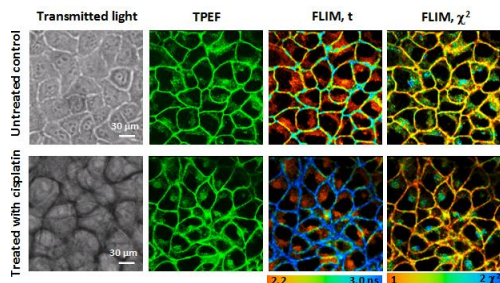
Химический FLIM-сенсор вязкости на основе BODIPY.

Клеточная линия CT26.

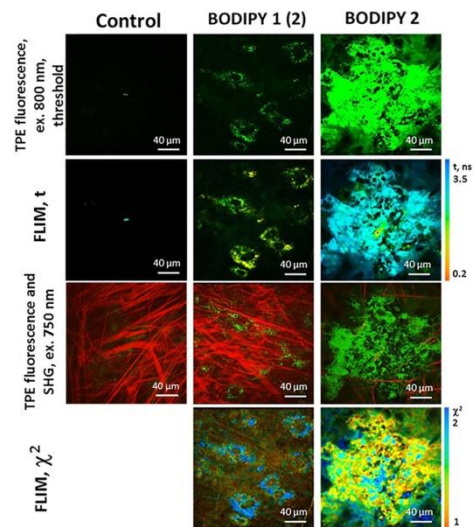
CT26 cells in vitro



2.64 ± 0.09 ns, 377 ± 27 cP



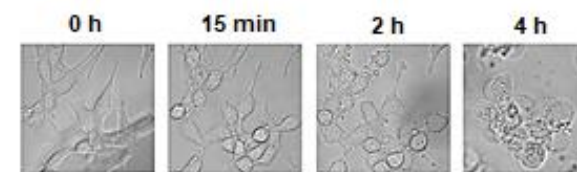
CT26 tumor in vivo



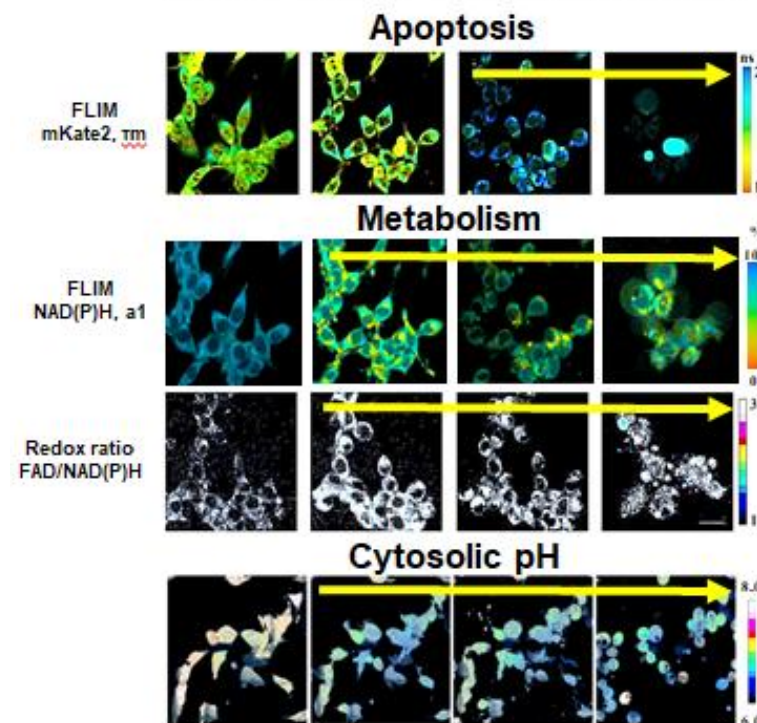
2.24 ± 0.06 ns, 265 ± 16 cP, 2.67 ± 0.06 ns, 386 ± 19 cP

- Разработаны методики измерения вязкости опухолевых клеток и коллагена.
- Показано повышение вязкости мембран после лечения цислатином

Мультипараметрический анализ апоптоза



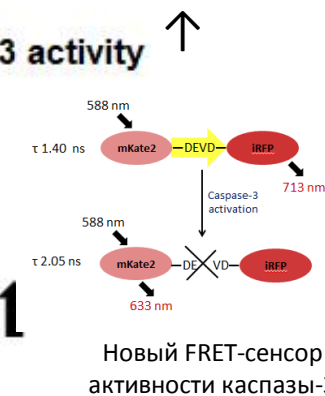
Индукция апоптоза стауроспорином. Одновременный имиджинг апоптоза и метаболизма или апоптоза и pH. Клеточная линия CT26.



Caspase-3 activity ↑

OXPPOS 1

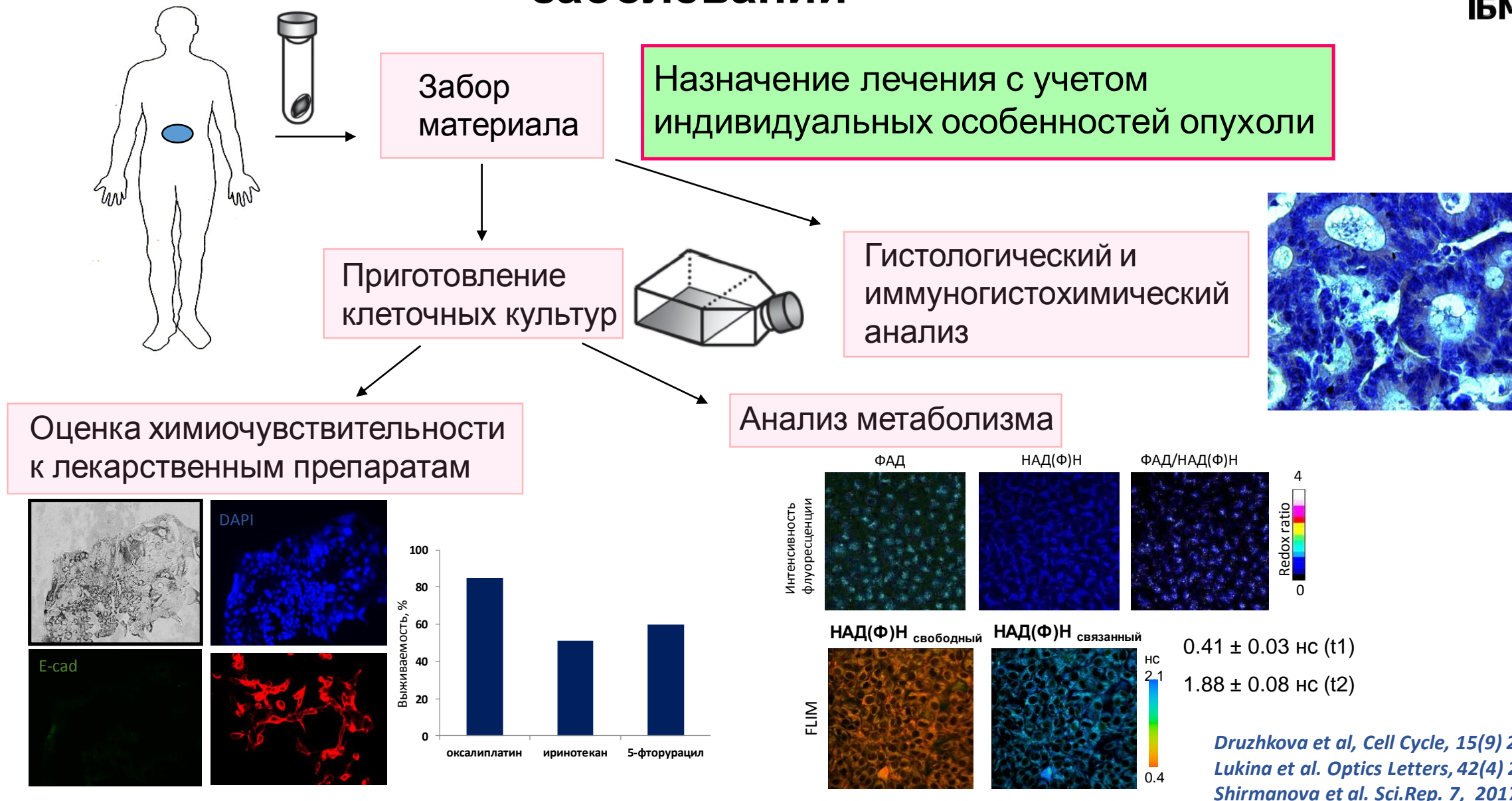
pH ↓



Новый FRET-сенсор активности каспазы-3

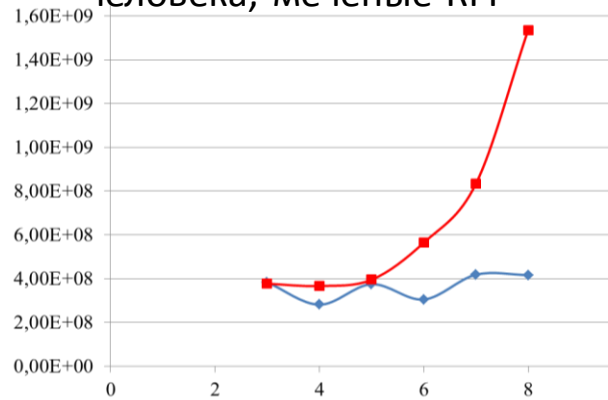
In vitro: закисление pH цитозоля и переход на окислительный метаболизм – ранние события при запуске апоптоза.

Способ персонализированной терапии онкологических заболеваний

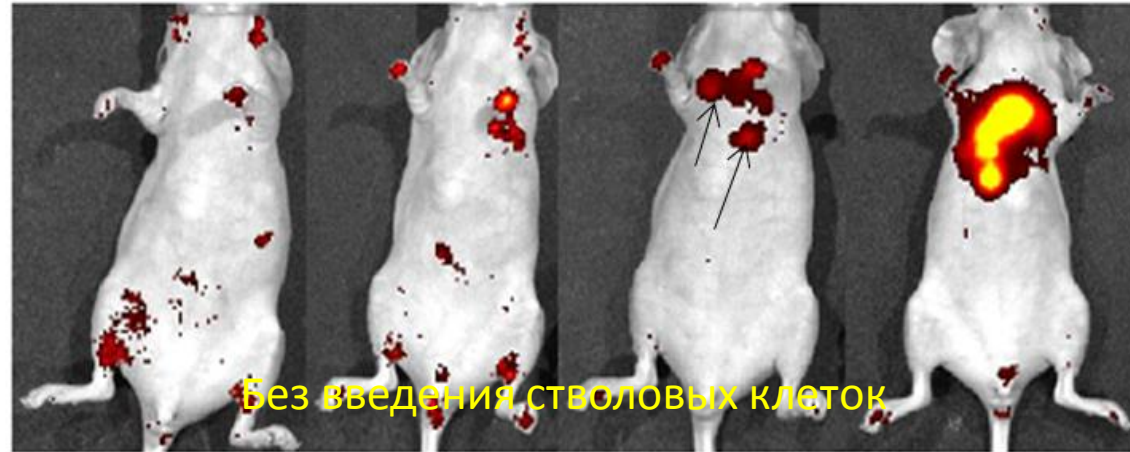


Влияние мезенхимных стволовых клеток на опухоль

Метастазы рака молочной железы человека, меченые RFP



Количество метастазов в легких



Без введения стволовых клеток

4 неделя

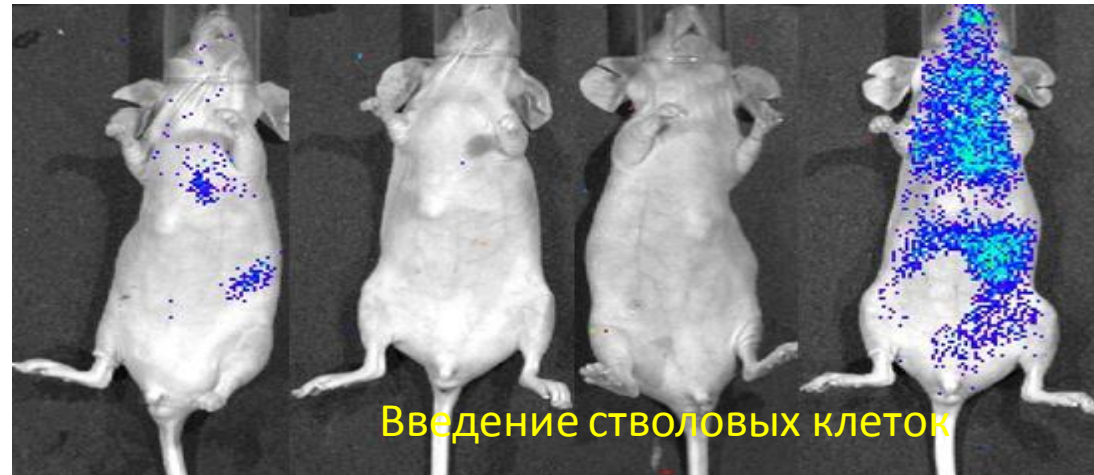
6 неделя

7 неделя

8 неделя

Метастазы

Мезенхимные стволовые клетки, меченые люциферазой



Введение стволовых клеток



Метастазов нет

Участие подсаженных МСК в формировании кости реципиента

Флуоресцентный имиджинг подсаженных МСК на скаффолдах

12 недель



MCK-GFP(+)

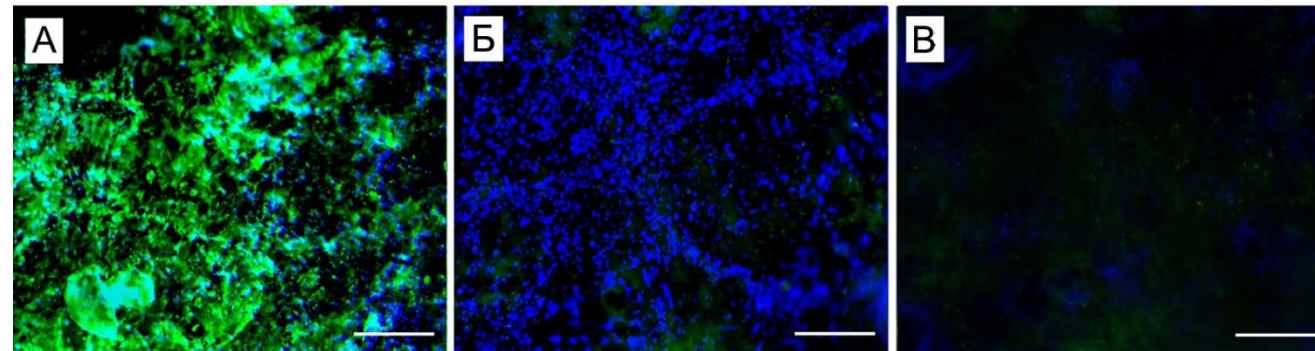


MCK-GFP(-)

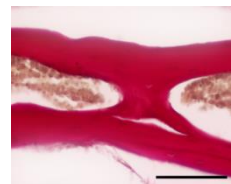


без МСК

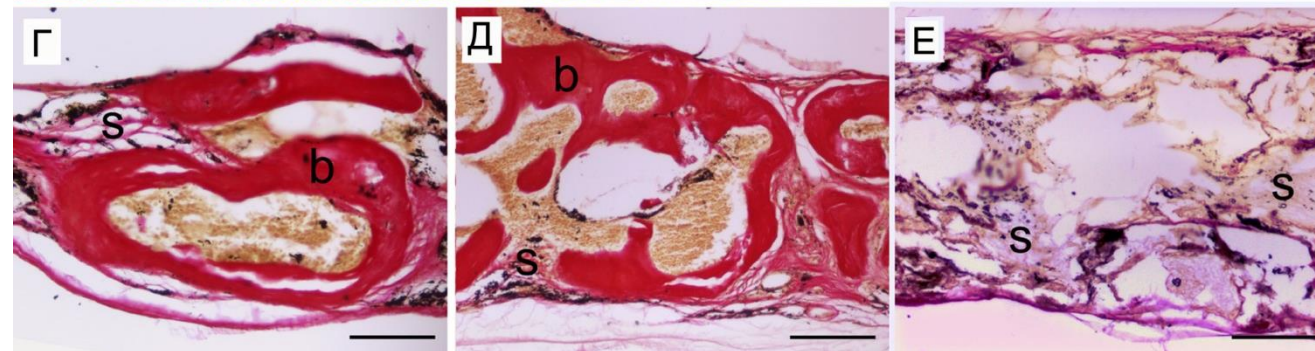
флуоресцентный имиджинг подсаженных МСК



морфологический анализ
(Окраска по Ван Гизону)



Интактная кость черепа мыши



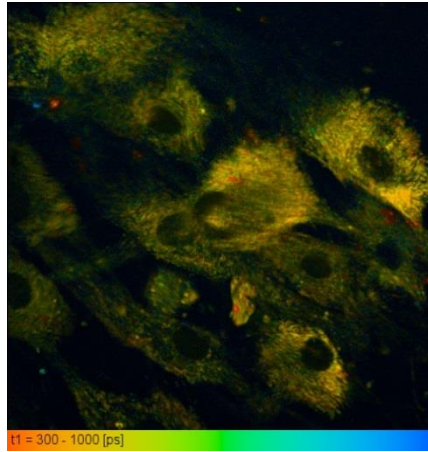
Ядра докрасшены **Hoechst**. s – материал скаффолда; b – костная ткань

Шкала 250 мкм

Изменения в метаболизме МСК при адипогенной дифференцировке



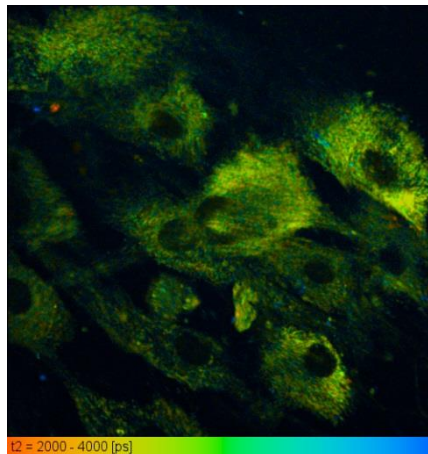
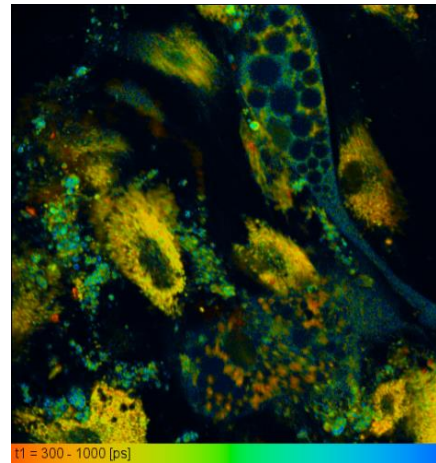
Недифференцированные
клетки



$\tau 1$

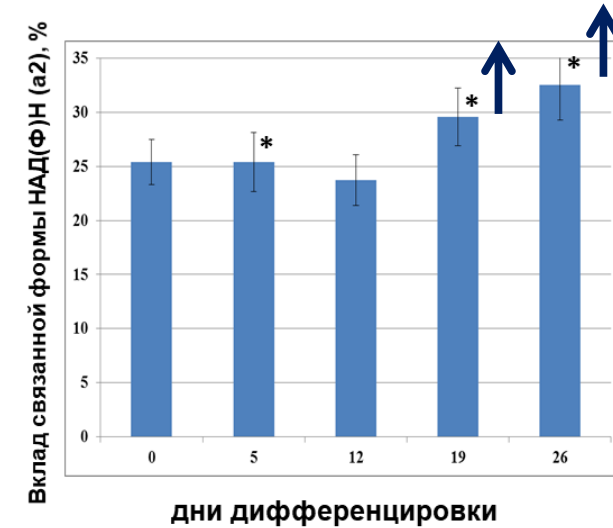
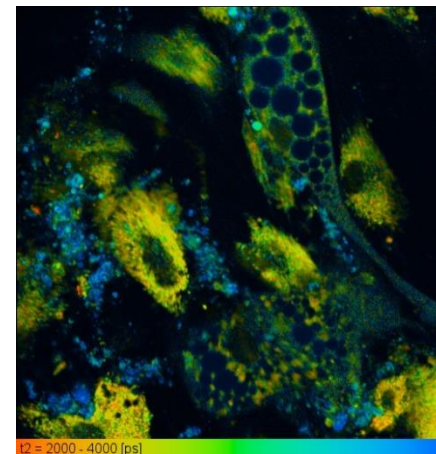
Свободная форма
НАД(Ф)Н

Адипогенно дифференцированные
клетки (26 день)



$\tau 2$

Связанная форма
НАД(Ф)Н



дни дифференцировки
- статистически значимые различия с группой
"0 день дифференцировки", $p < 0.05$

Перераспределение
вкладов метаболических
путей от **гликолиза** к **ОкФос**

МУЛЬТИМОДАЛЬНАЯ ОКТ (ИПФ РАН-ПИМУ, г. Нижний Новгород)



ММ ОКТ прибор
(ИПФ РАН) Н. Новгород

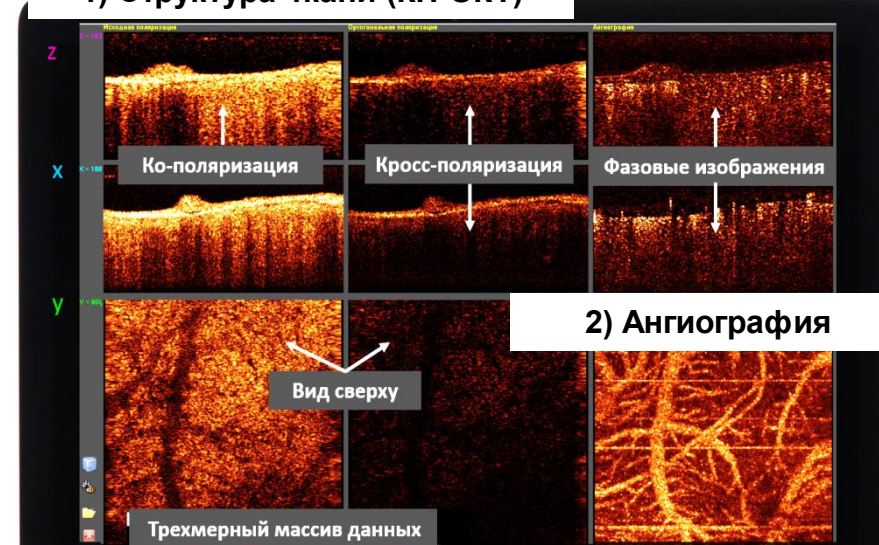


Параметры изображения:
Глубина сканирования – 1,7 мм
Время 3Д сканирования – 26 сек
Объем сканирования ткани –
2,4x2,4x1 мм³
(3,4x3,4x1 мм³)

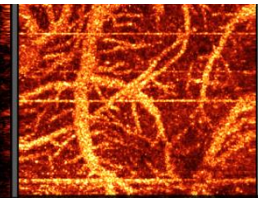
Источник излучения –
суперлюминесцентный диод
Длина волны – 1310 нм
Мощность излучения – 2 мВт на
объекте
Разрешение по глубине – 10 мкм
Поперечное разрешение – 15 мкм
Спектральная – 20 000 А-сканов/с
Вес 10 кг



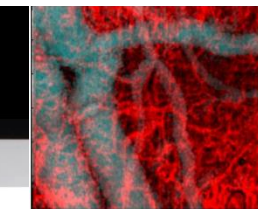
1) Структура ткани (КП ОКТ)



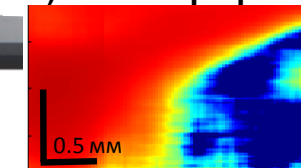
2) Ангиография



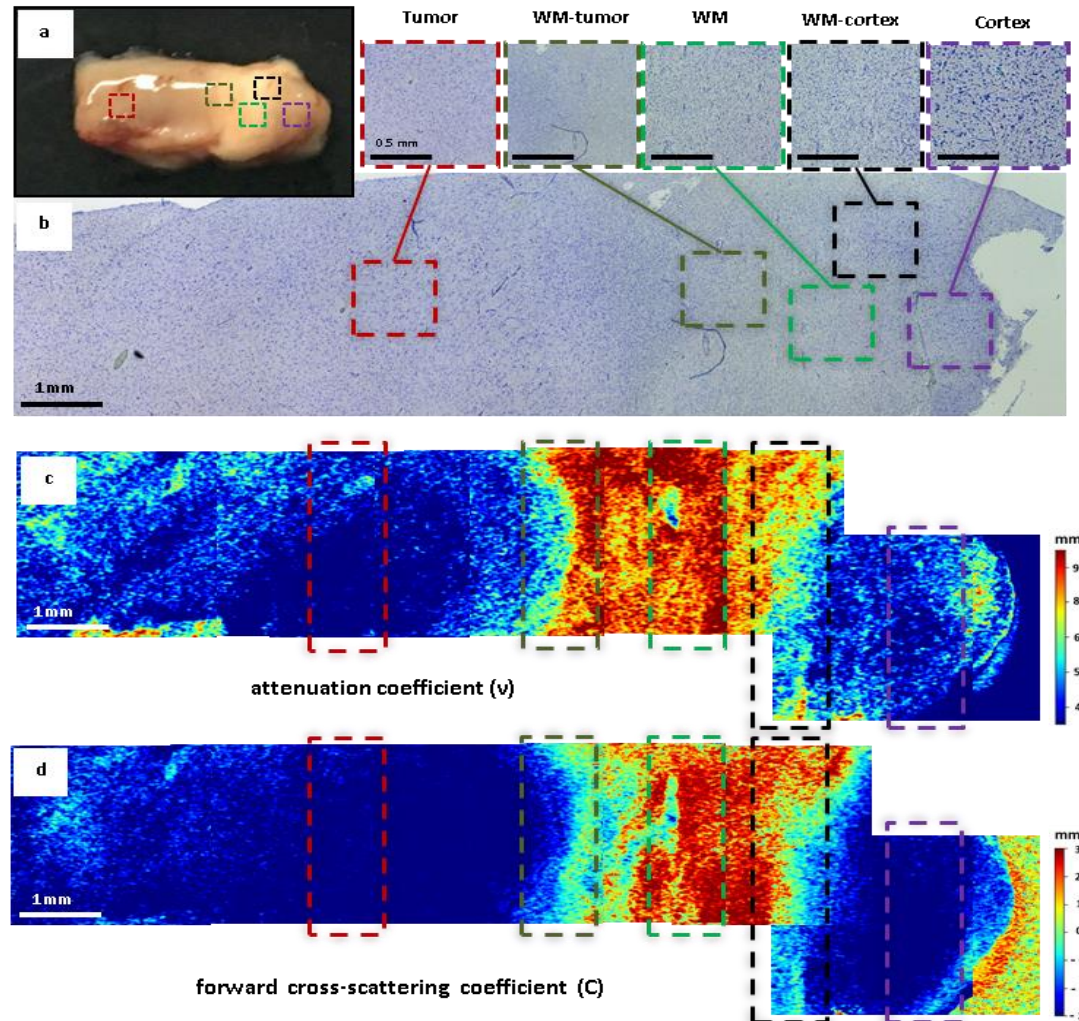
3) Лимфоангиография



4) Эластография



Возможности интраоперационного поиска чистого края резекции глиом мозга методом кросс-поляризационной ОКТ

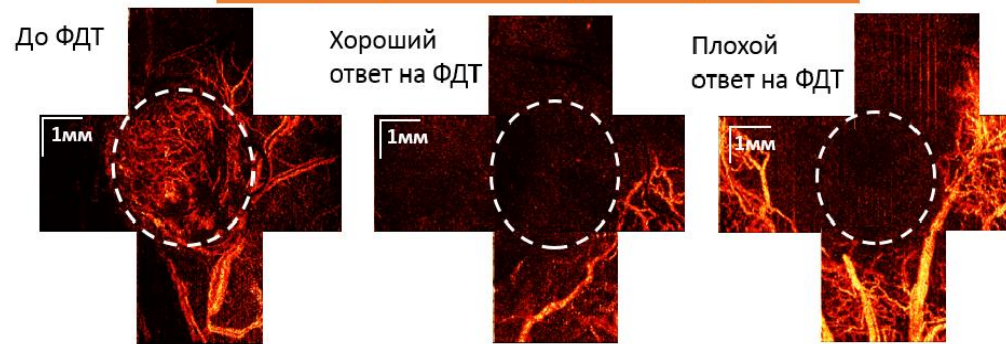


Мониторинг ответа опухолей на лечение методом мультимодальной оптической когерентной томографии

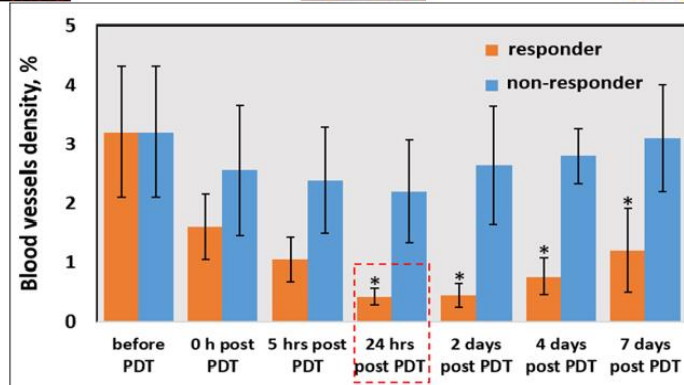
Эффективность ФДТ

ОКТ ангиография опухолей после фотодинамической терапии

Реакция нормальных сосудов вокруг опухоли



Мыши опухоль СТ26

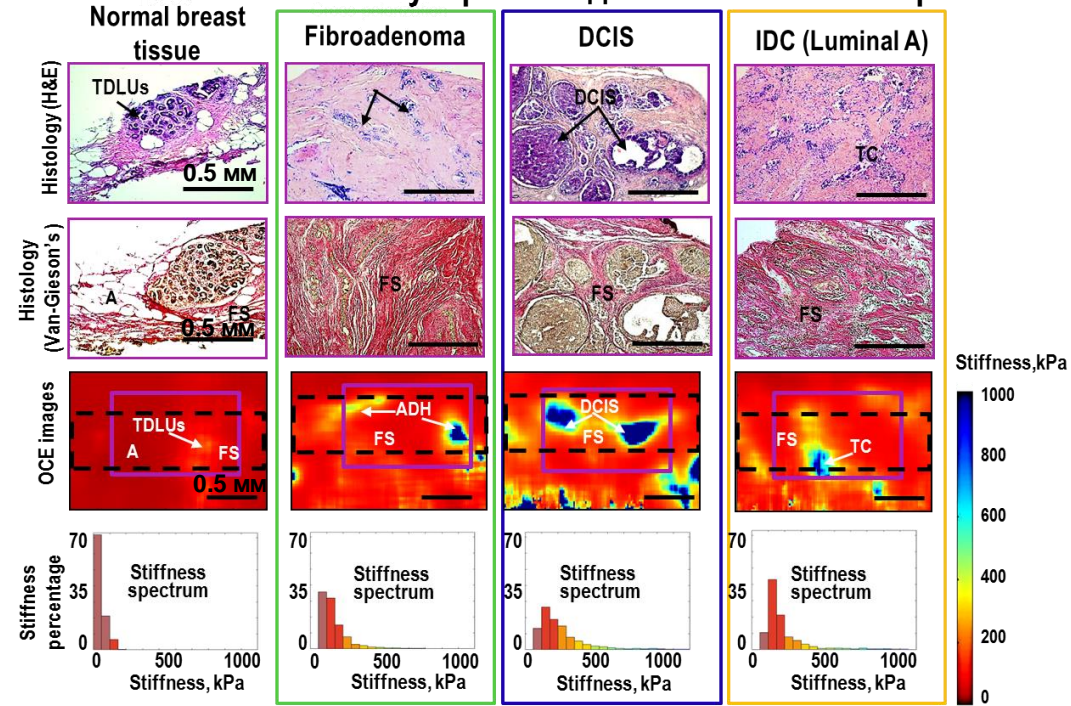
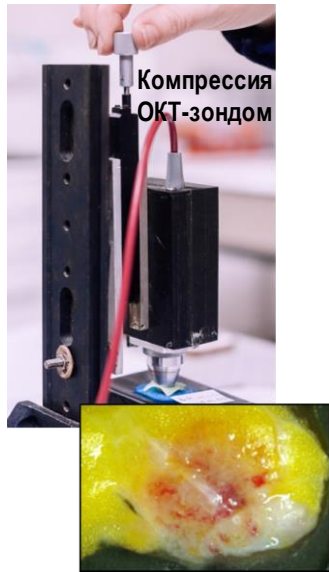


*-статистически значимое отличие от группы non-responder

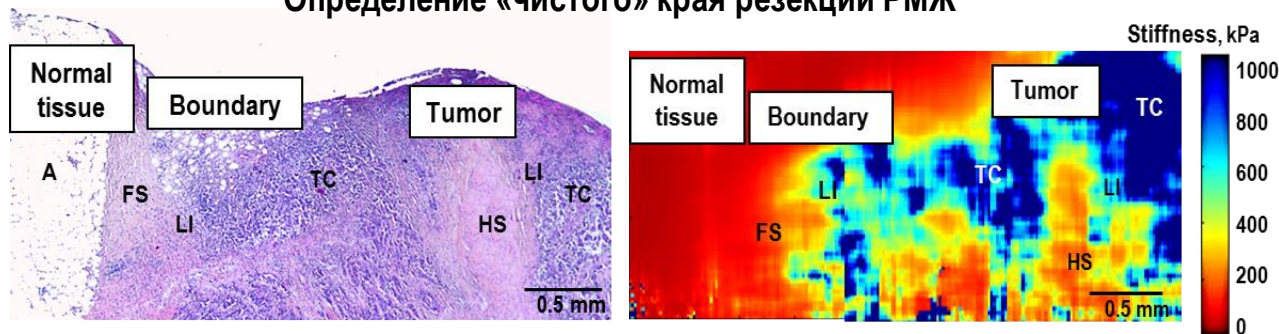
Разработан критерий эффективного ответа опухоли на ФДТ - исчезновение через 24 часа после процедуры сосудов в опухоли на ОКТ ангиограмме и снижение их числа в окружающих тканях.

ОКТ-эластография для оценки рака молочной железы

Основные молекулярные подтипы инвазивного протокового РМЖ



Определение «чистого» края резекции РМЖ



TC – опухолевые клетки;
 FS – фиброз стромы;
 HS – гиалиноз стромы;
 LI – лимфогистиоцитарное воспаление;
 DCIS – внутрипротоковый рак *in situ*