

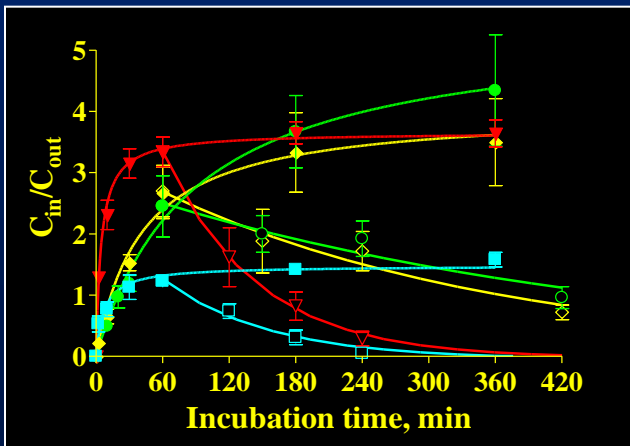
Микроскопия и микроспектроскопия биообъектов. Детекция наночастиц.

Алексей Валерьевич Феофанов

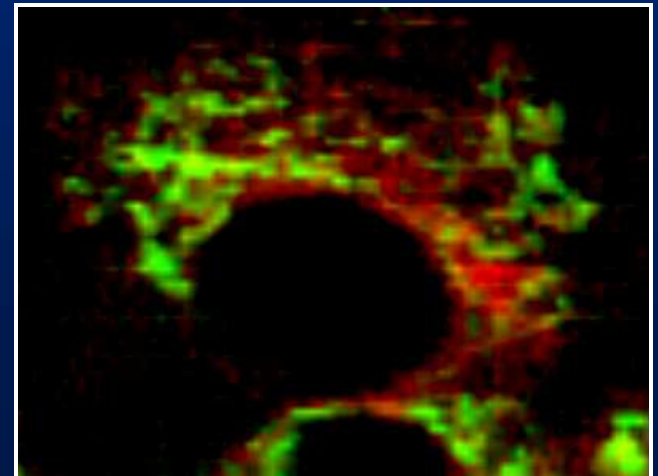
Кафедра биоинженерии

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии
биомолекул
ИБХ РАН



Лекция № 3



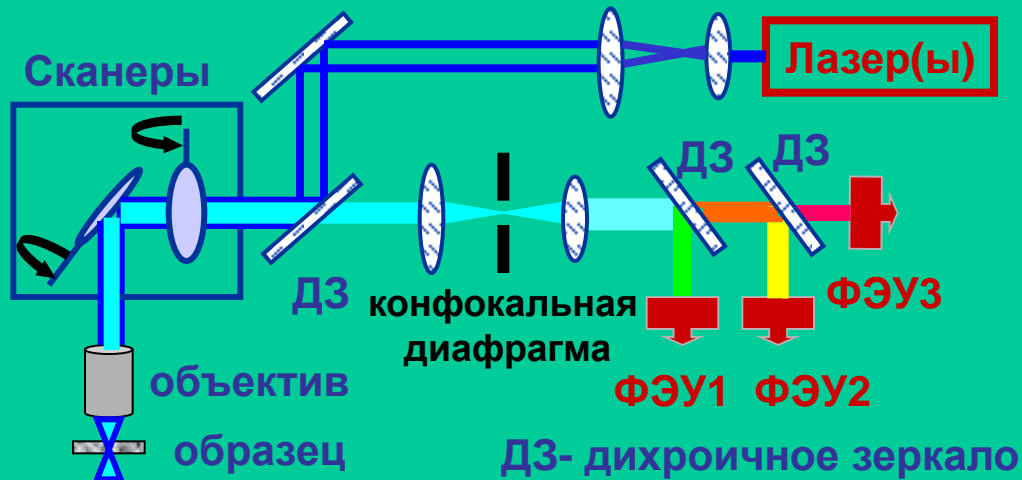


Схема лазерного сканирующего конфокального микроскопа

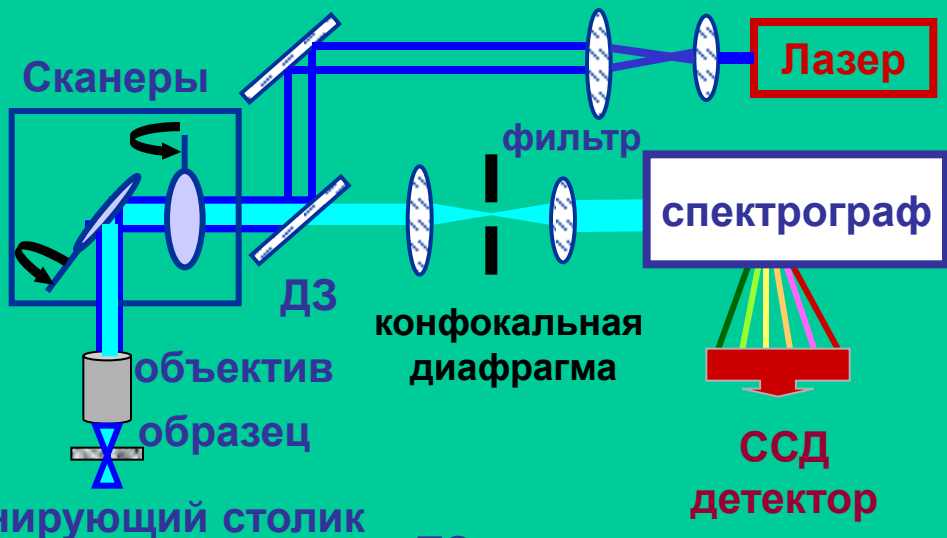
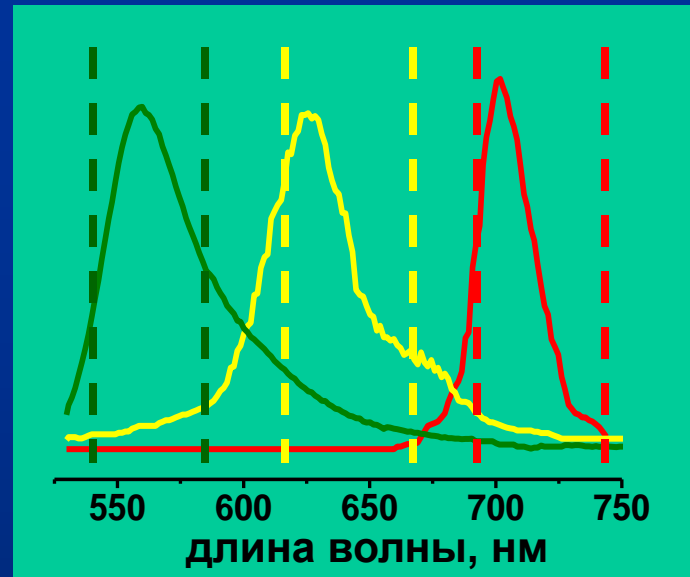
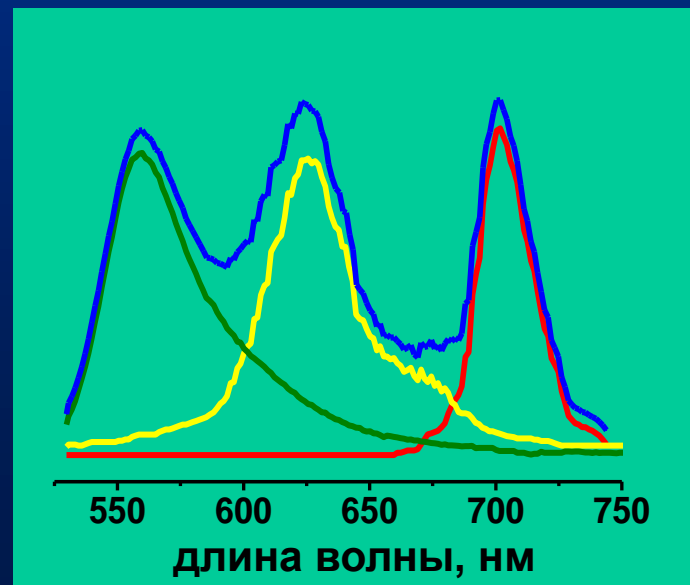
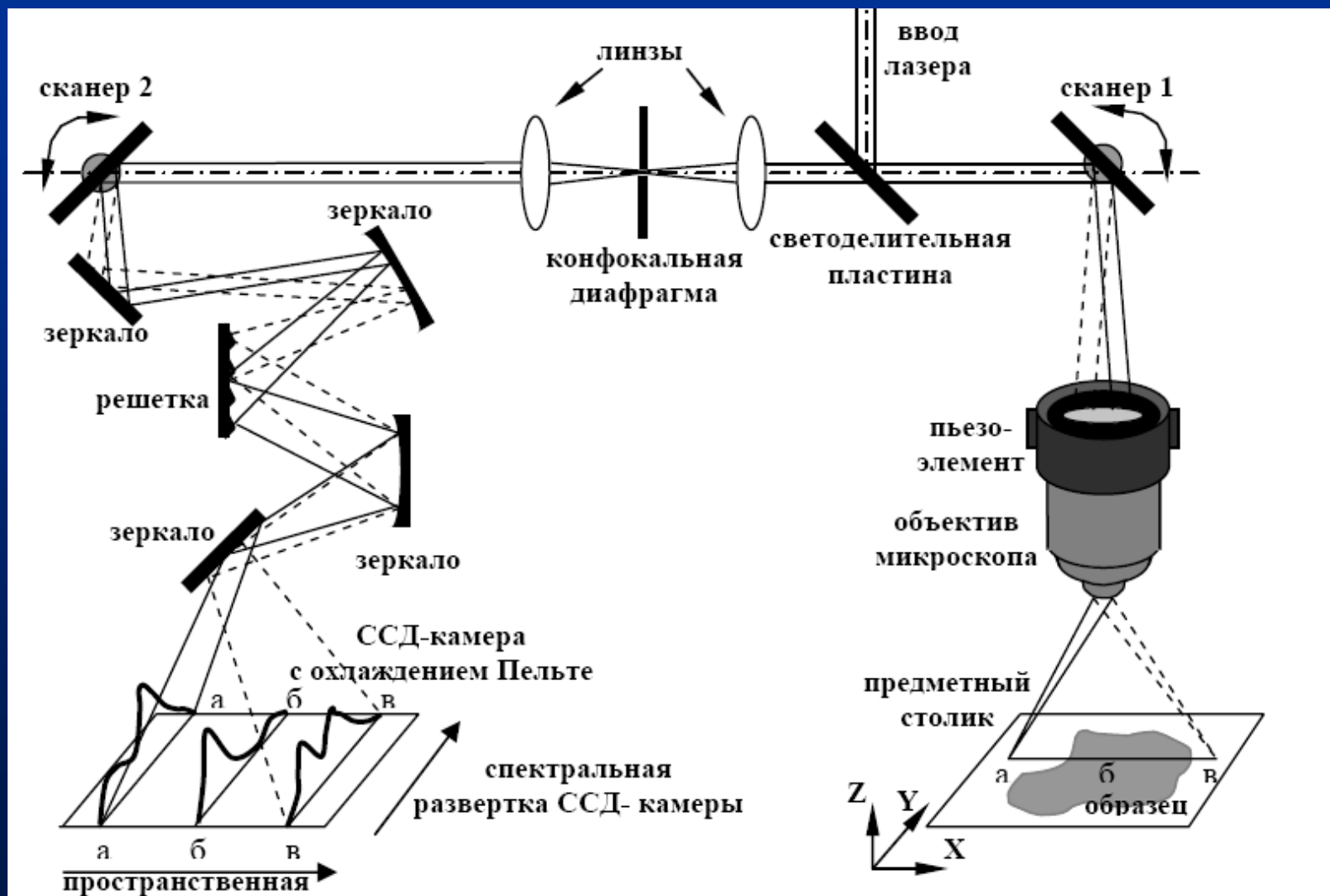


Схема лазерного сканирующего конфокального спектрального микроскопа



Принципиальная схема линейного сканирования, используемая в приборе для конфокальной сканирующей микроспектроскопии фирмы Dilor



Метод конфокальной микроспектроскопии и реконструкции спектральных изображений (КОМИРСИ) -

количественный метод исследования накопления, локализации и молекулярных взаимодействий биологически-активных соединений (БАС) в биологических образцах

- **метод КОМИРСИ** – специальная разновидность лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ)
- **особенность:** регистрируются полные спектры флуоресценции (или КР) от каждого микрообъема сканируемой области
- **преимущество:** все спектральные параметры доступны для анализа, включая
 - интенсивность
 - ширина спектра
 - форма
 - положение максимума

Алгоритм, лежащий в основе метода КОМИРСИ

Измерение спектральных изображений (2D массивов спектров) с 3D разрешением

1. Конфокальный сканирующий микроспектрометр используется для измерения в каждой точке сканируемого оптического сечения образца полных спектров флуоресценции. Важно, что эти спектры измеряются с трехмерным (как правило, субмикронным) пространственным разрешением;

2. Измеренный двумерный (2D) набор спектров в полном объеме сохраняется в виде файла, что дает отсроченную возможность многократного анализа этих спектров и использования их для реконструкции спектральных изображений на основе различных вариантов интерпретации обнаруженных сигналов;

3. Измерения повторяются для аналогичных образцов (например, группы клеток, серии срезов ткани) приготовленных в тех же и измененных условиях;

Алгоритм, лежащий в основе метода КОМИРСИ

Измерение спектральных изображений (2D массивов спектров) с 3D разрешением

Анализ спектральных изображений, моделирование в растворах

выбор базисного набора спектров сравнения

4. Интерактивный анализ 2D массива спектров. Используется информация о числе и природе присутствующих в образце флуорофоров.

Моделируются состояние, микроокружение и молекулярные взаимодействия хромофоров в растворах.

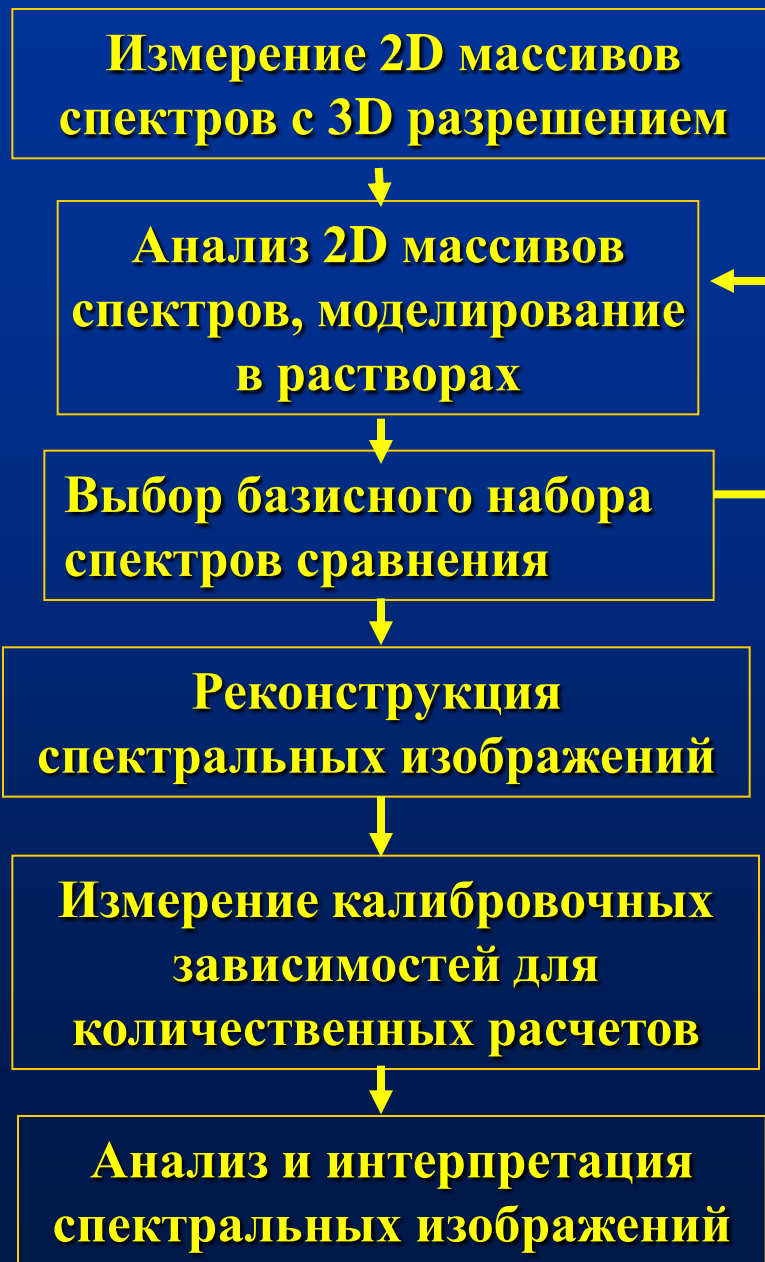
С привлечением модельных спектров флуоресценции этих флуорофоров определяется набор спектров сравнения для разложения экспериментальных спектров по базису.

Точность и адекватность этого разложения контролируется, как для всех измеренных точек одного образца, так и для аналогичных образцов.

На основе обнаруженных неточностей разложения выявляются недостающие спектры сравнения и/или уточняются условия измерения спектров от изолированных хромофоров для более точного описания всех спектров, наблюдаемых в образцах.

В результате формируется окончательный базисный набор спектров сравнения, точно и адекватно описывающий каждый спектр исследуемого образца.

Алгоритм, лежащий в основе метода КОМИРСИ



Измерение калибровочных зависимостей для количественных расчетов

- С использованием одного из модельных растворов БАС должна быть измерена калибровочная зависимость интегральной интенсивности спектра от концентрации мономерной формы БАС в растворе.
- Это измерение следует проводить на том же приборе, с той же длиной волны возбуждения, при той же мощности лазера, напряжении на ФЭУ и с тем же разрешением ΔZ , что и измерения на клетках.
- Время накопления спектров может быть любым, но тогда интенсивность калибровочных спектров подлежит коррекции (подразумевается, что интенсивность спектра прямо пропорциональна времени накопления), с учетом времени накопления внутриклеточных спектров.
- Подобрать в модельных экспериментах условия, в которых происходят изменения формы спектров БАС точно и адекватно отражающие изменения формы спектров БАС в клетках, мы полагаем, что и интенсивности сигналов эквимолярных количеств БАС в клетке и в модельных условиях будут одинаковыми. Тогда сравнивая интенсивности одинаковых по форме спектров от равных микрообъемов клетки и модельного раствора с известной концентрацией БАС, можно оценить концентрацию БАС (его комплексов) в микрообъеме клетки.

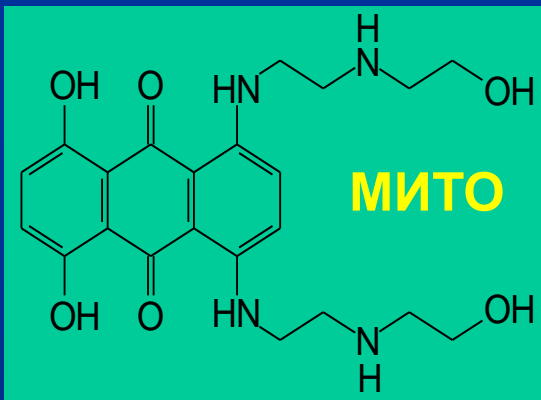
Метод КОМИРСИ предоставляет уникальные возможности для изучения флуоресцирующих противоопухолевых соединений в живых клетках

Молекулярные взаимодействия, в которых участвует БАС, могут вызывать заметные изменения его спектров флуоресценции.

Анализ внутриклеточных спектров БАС методом КОМИРСИ - путь к идентификации и изучению молекулярных взаимодействий и микроокружения БАС в живых клетках.

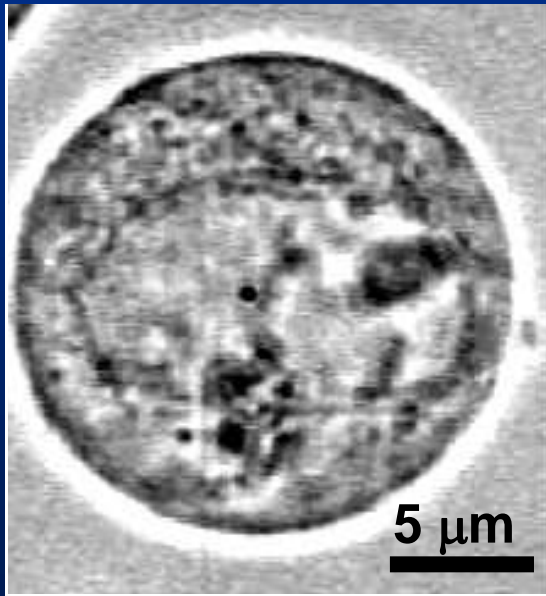
Регистрация внутриклеточных молекулярных взаимодействий БАС— это ключ к пониманию механизмов их функциональной активности.

Противоопухолевый агент митоксантрон (МИТО)

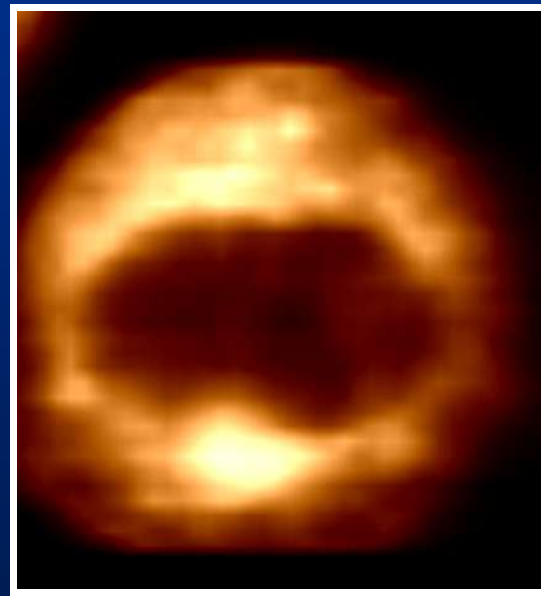


Лечит острый нелимфоцитарный лейкоз, распространенный рак молочной железы и неходжкинские лимфомы

флуоресценция МИТО в живых клетках эритролейкоза человека K562



Изображение клетки в проходящем белом свете

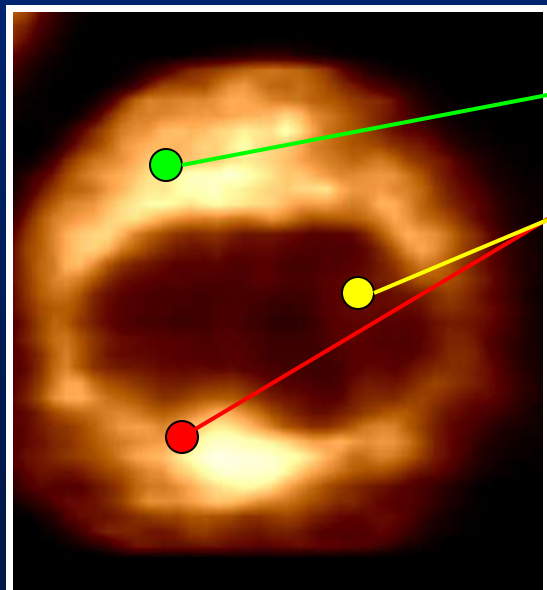
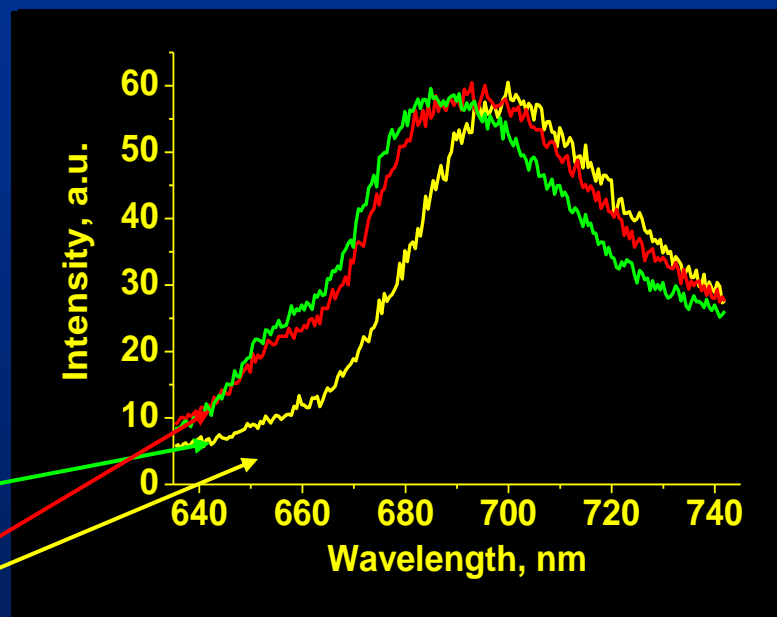
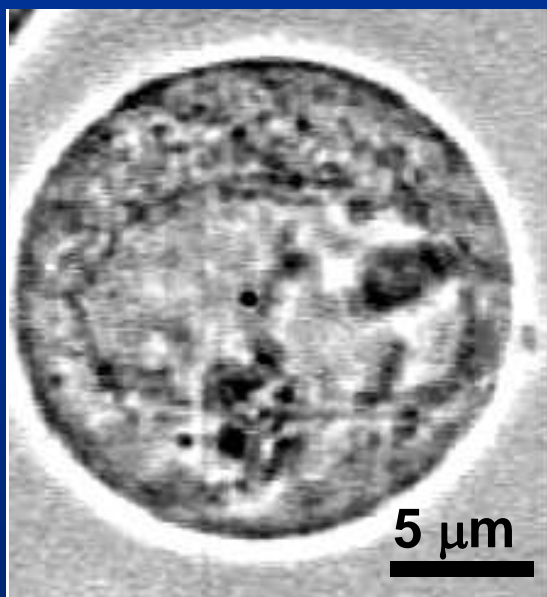


флуоресцентное изображение клетки, измеренное с помощью обычного ЛСКМ

Отражает ли это изображение реальное распределение МИТО в клетке?

Нет!

Исследование распределения и молекулярных взаимодействий противоопухолевого препарата митоксантрон в живых раковых клетках K562 методом КОМИРСИ



Внутриклеточные спектры митоксантрона отличаются по интенсивности и форме

Конфокальное изображение распределения внутриклеточной интенсивности флуоресценции митоксантрона

Модельные эксперименты в растворах

Параметры спектров флуоресценции МИТО и НХМ в различном микроокружении, комплексах и смесях

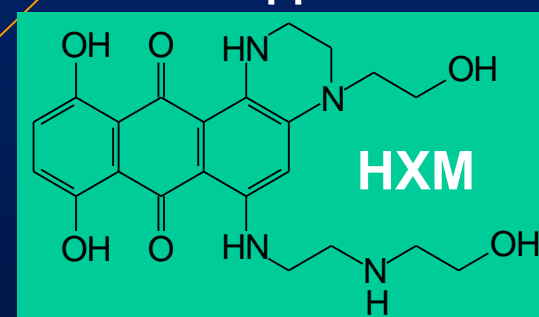


Растворитель, условия	$\lambda_{\text{макс}}, \text{нм}$	$\Delta\lambda, \text{нм}$	$I_{\text{отн}}$
МИТО, PBS pH7,4	685	58	1,0
МИТО, PBS pH10	685	58	0,1
МИТО, PBS pH4,5	685	58	0,8
МИТО, метанол	686	58	2,9
МИТО, этанол	692	49	2
МИТО, пропанол	694	46	2,1
МИТО, Тритон X-100	685	54	2,1
МИТО -ДНК (1/17 п.о.)	700	50	0,65
МИТО -РНК (1/29 о.)	690	56	
МИТО -ДНК-топо II	700	50	0,65
МИТО -топо II	685	58	1,0
НХМ, PBS pH7,4	652	46	
НХМ, диоксан	652	36	

Влияние pH

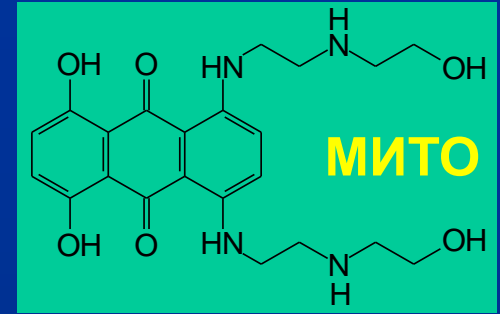
Влияние гидрофобности микроокружения

Влияние молекулярных взаимодействий



метаболит

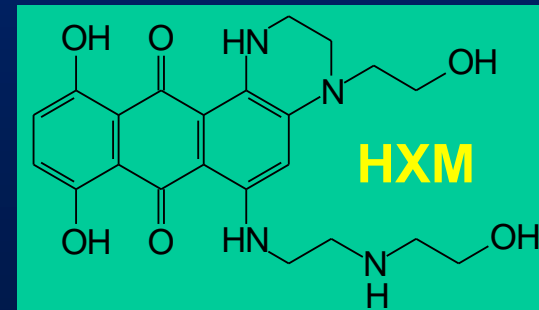
Модельные спектры, описывающие внутриклеточное состояние МИТО



МИТО в полярном микроокружении

МИТО в гидрофобном микроокружении

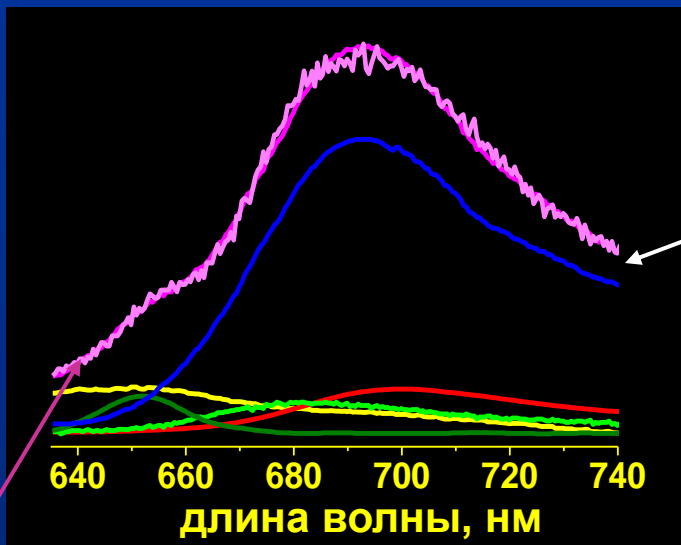
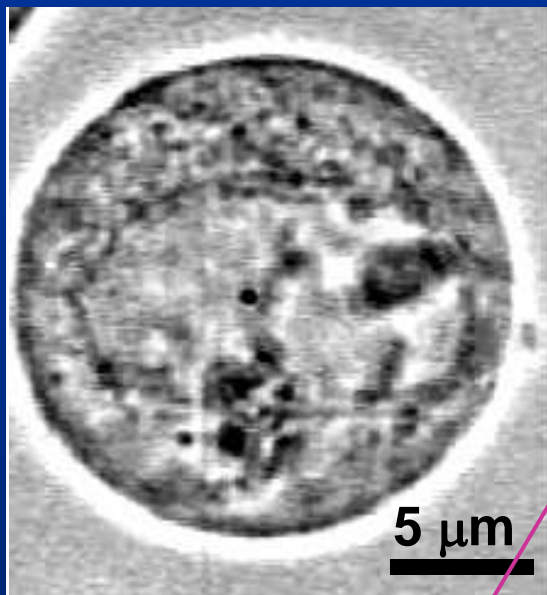
комплексы МИТО с нуклеиновыми кислотами



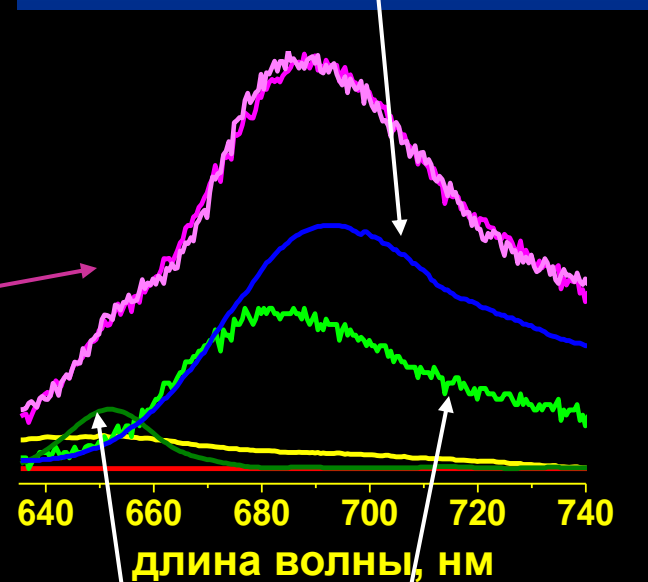
метаболит

Растворитель, условия	$\lambda_{\text{макс}}, \text{нм}$	$\Delta\lambda, \text{нм}$	$I_{\text{отн}}$
МИТО, PBS pH7,4	685	58	1,0
МИТО, пропанол	694	46	2,1
МИТО-ДНК (1/17 п.о.)	700	50	0,65
+ спектр собственной клеточной флуоресценции			
НХМ, диоксан	652	36	

Спектры из каждого микрообъема образца представляются в виде линейной суперпозиции модельных спектров



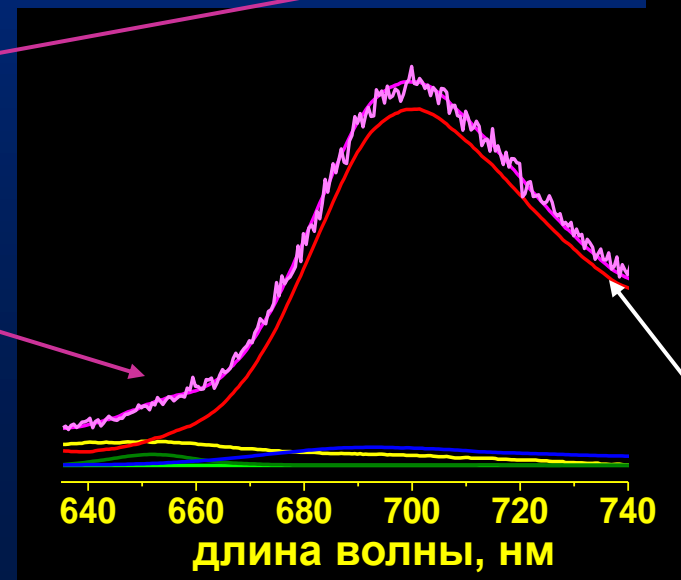
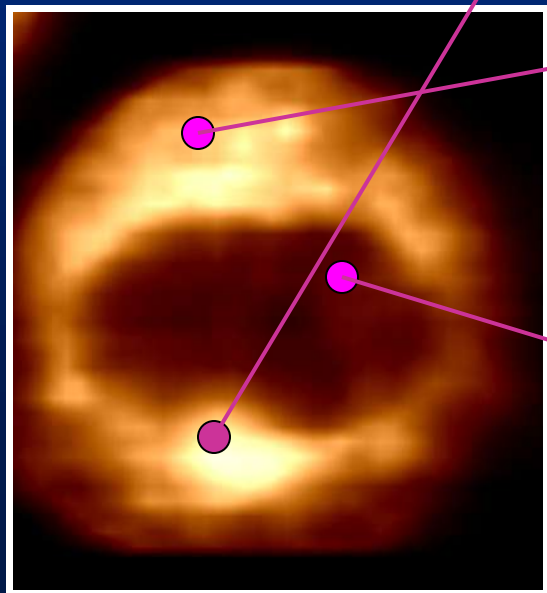
МИТО-гидрофоб.



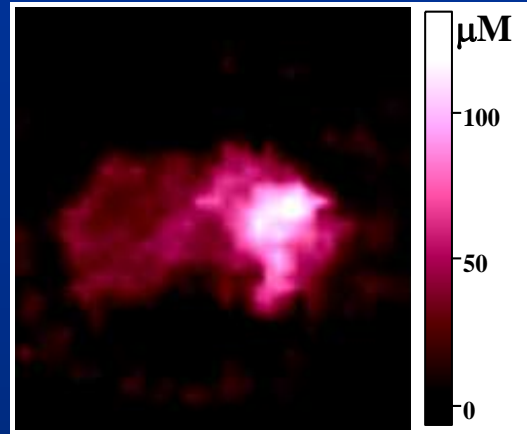
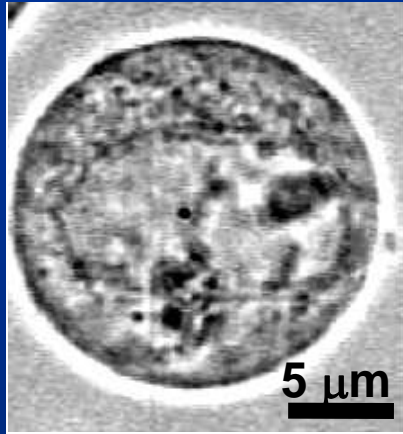
НХМ

МИТО-поляр.

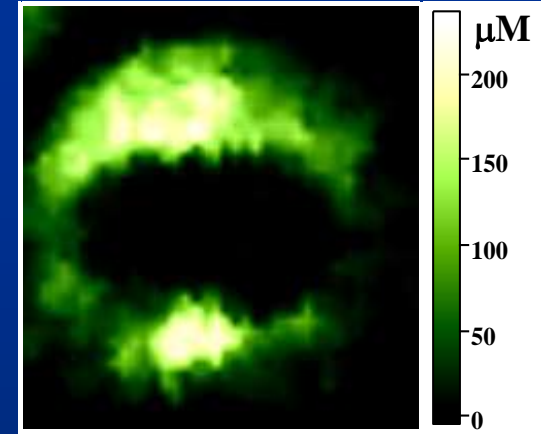
МИТО-ДНК



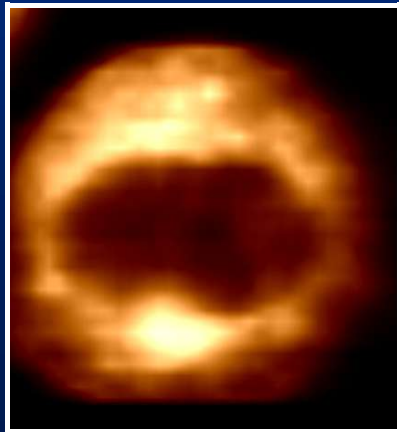
Спектральные изображения- количественные карты внутриклеточного распределения митоксантрона в различных состояниях и комплексах



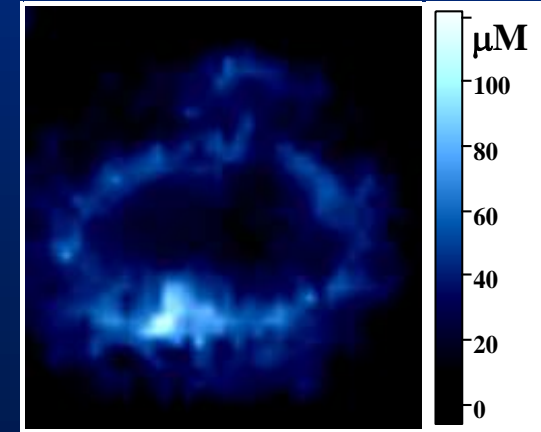
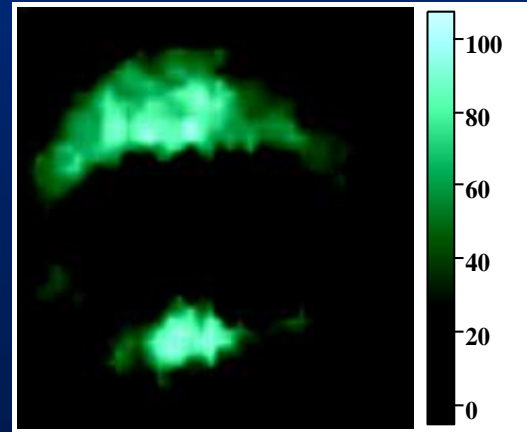
МИТО-ДНК



МИТО в полярном окружении и в митохондриях



NQX
метаболи
T



МИТО в гидрофобном
окружении

Средняя внутриклеточная концентрация МИТО в различных состояниях и комплексах в клетках К562 по данным метода КОМИРСИ

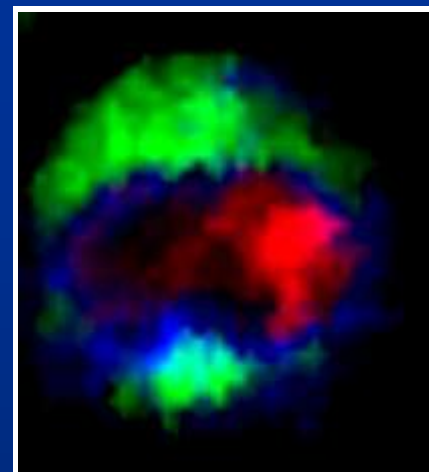
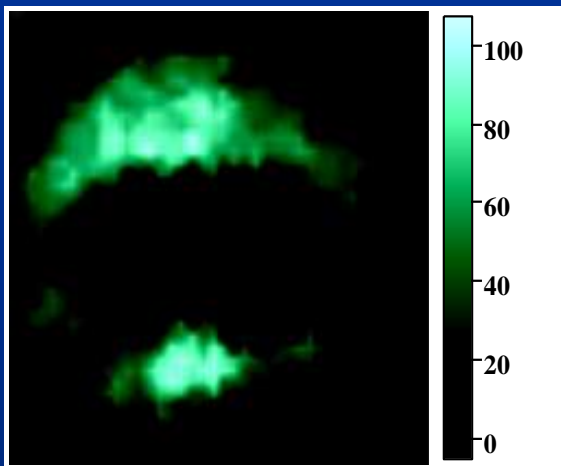
Состояние МИТО в клетках	Средняя концентрация МИТО			
	цитоплазма, мкМ	ядро, мкМ	нуклеоли, мкМ	нуклеоплазма, мкМ
МИТО-ДНК	11±7	270±170	410±150	203±135
МИТО-гидрофобное окружение	54±36	31±22		
МИТО-полярное окружение	75±47	22±12		

инкубация: 10 мкМ МИТО, 1 ч

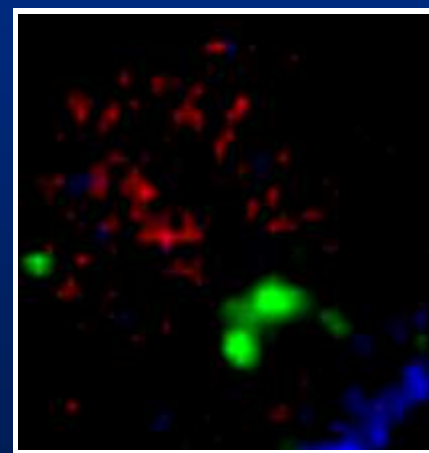
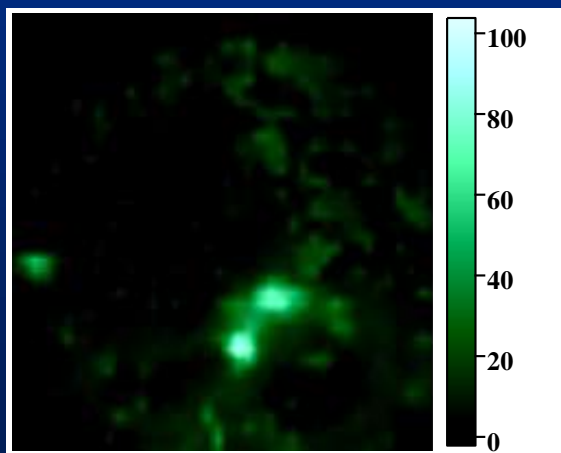
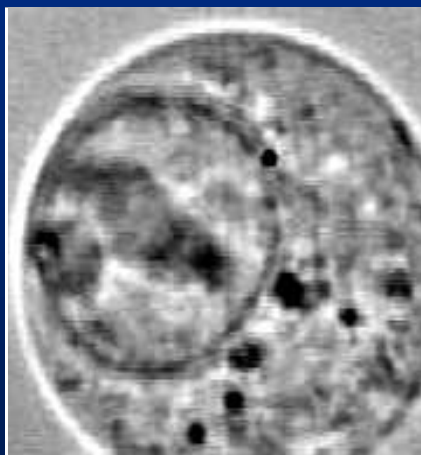
Метод может быть весьма полезен при разработке и скрининге новых производных противоопухолевых соединений, так как позволяет количественно сравнить их по способности накапливаться в клетках, образовывать комплексы с молекулярными клеточными мишенями, преодолевать механизмы МЛУ, позволяет выявить многие взаимосвязи между структурой соединений и их активностью.

Распределение и взаимодействия МИТО в клетках K562 в сравнении с резистентными клетками K562R.

K562



K562R

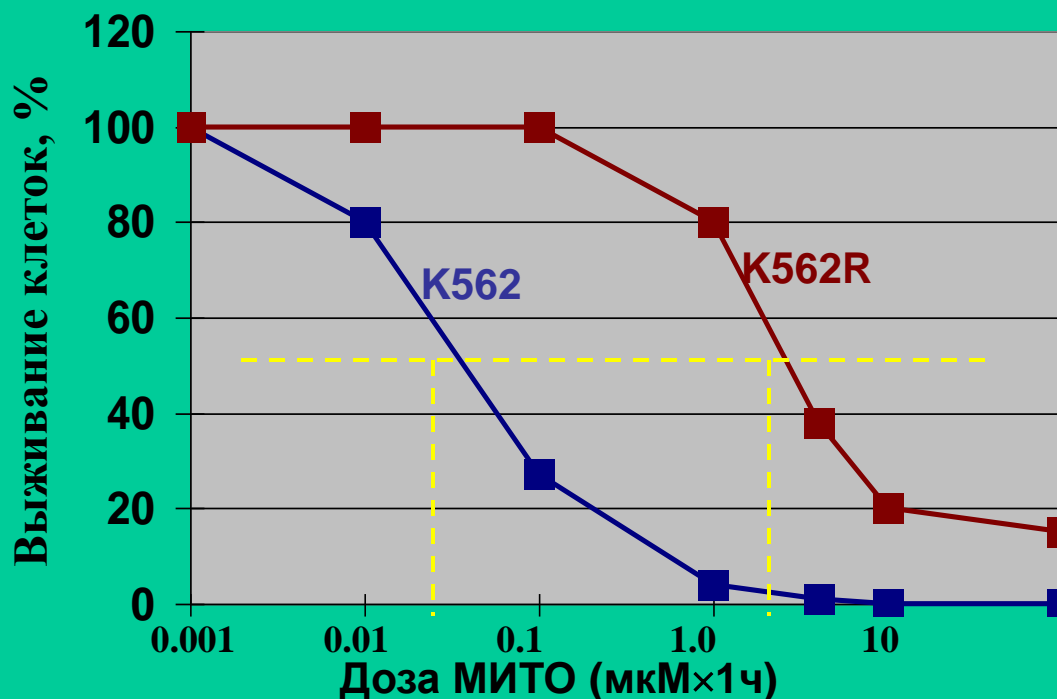


инкубация
: 10 мкМ
МИТО, 1 ч

МИТО в
МИТО в периферическом
окружении
окружении

Совмещенные
изображения

Ингибирование роста клеток МИТО



$$IC_{50}(K562) = 2 \times 10^{-8} \text{ M}$$

$$IC_{50}(K562R) = 3 \times 10^{-6} \text{ M}$$

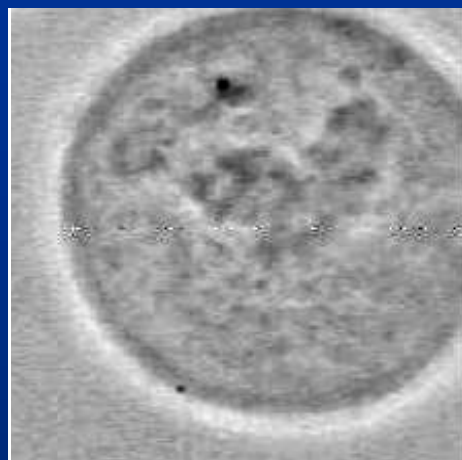
Фактор резистентности = 66

Факторы, дающие вклад в резистентность клеток K562R

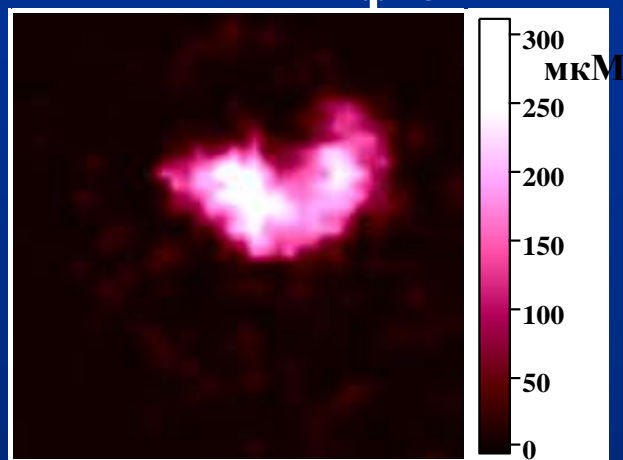
- ❖ Снижение клеточного накопления
- ❖ Уменьшение связывания МИТО
- ❖ Изменение локализации в клетках

	C(K562)/ C(K562R)
Внутриклеточная концентрация	7
МИТО-ДНК	20
Комплексы МИТО с гидрофобными структурами	10
МИТО свободный или связанный в полярном окружении	3

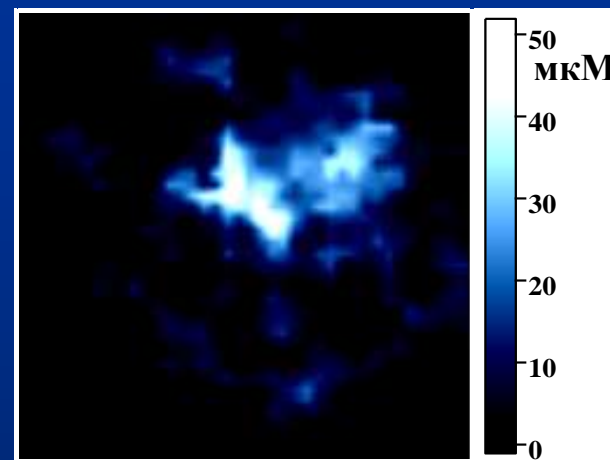
При изучении особенностей внутриклеточного накопления и распределения МИТО на разных стадиях клеточного цикла обнаружено, что МИТО вызывает остановку цикла клеток K562 в митозе на стадии анафазы



инкубация: 10 мкМ
МИТО, 1 ч



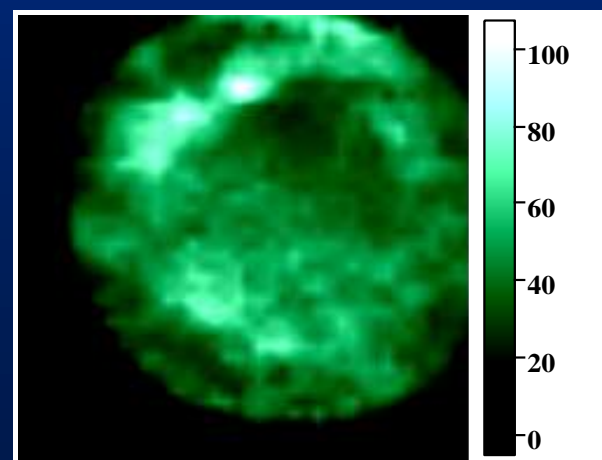
МИТО-ДНК



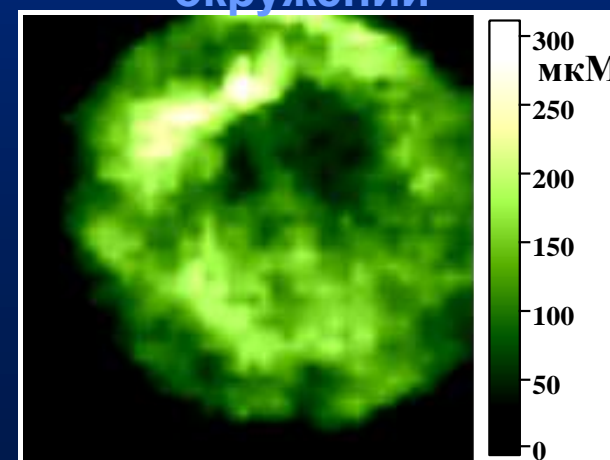
МИТО в гидрофобном
окружении



Совмещенные
изображения



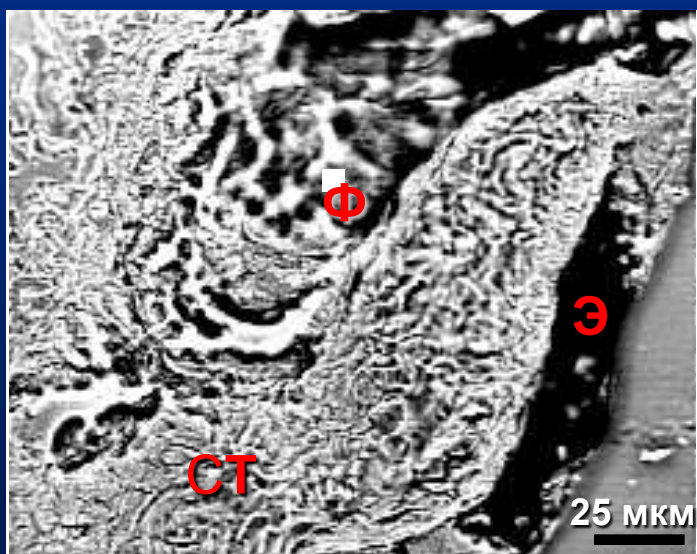
НХМ
метаболит



МИТО в полярном
окружении

Метод КОМИРСИ применим для изучения тканевого распределения, как флуоресцирующих БАС, так и нефлуоресцирующих, но обладающих интенсивным поглощением.

В последнем случае используется измерение колебательных спектров БАС на основе эффекта резонансного КР.



Микрофотография среза
ткани мыши



распределение октакарбокситалоцианина
кобальта, измеренное на основе эффекта
резонансного КР

Э- эпидермис, СТ – соединительная ткань, Ф- волосяной фолликул

Метод КОМИРСИ является высокоинформативным инструментом для разработки, скрининга и доклинических исследований новых противоопухолевых и других БАС, изучения механизмов их действия

Наиболее очевидным и уникальные преимущества метода КОМИРСИ:

- 1. возможность обнаружения и идентификации молекулярных комплексов БАС в живых клетках;**
- 2. возможность количественного статистически достоверного анализа накопления, локализации и взаимодействий БАС в клетках, в различных клеточных органоидах и тканевых структурах;**
- 3. возможность исследования особенностей молекулярных взаимодействий и механизмов действия БАС на разных уровнях структурной организации биологических объектов: в растворах, в живых клетках, в срезах ткани;**
- 4. возможность полного разделения перекрывающихся спектров нескольких флуорофоров в клетках, что снимает ряд ограничений на выбор флуоресцентных зондов и обеспечивает наиболее точный анализ в исследованиях клеточной локализации БАС.**

Недостатки метода КОМИРСИ:

- 1. значительные по сравнению с традиционной ЛСКМ временные затраты на измерение детальных 2D спектральных изображений;**
- 2. относительная сложность реализации метода.**

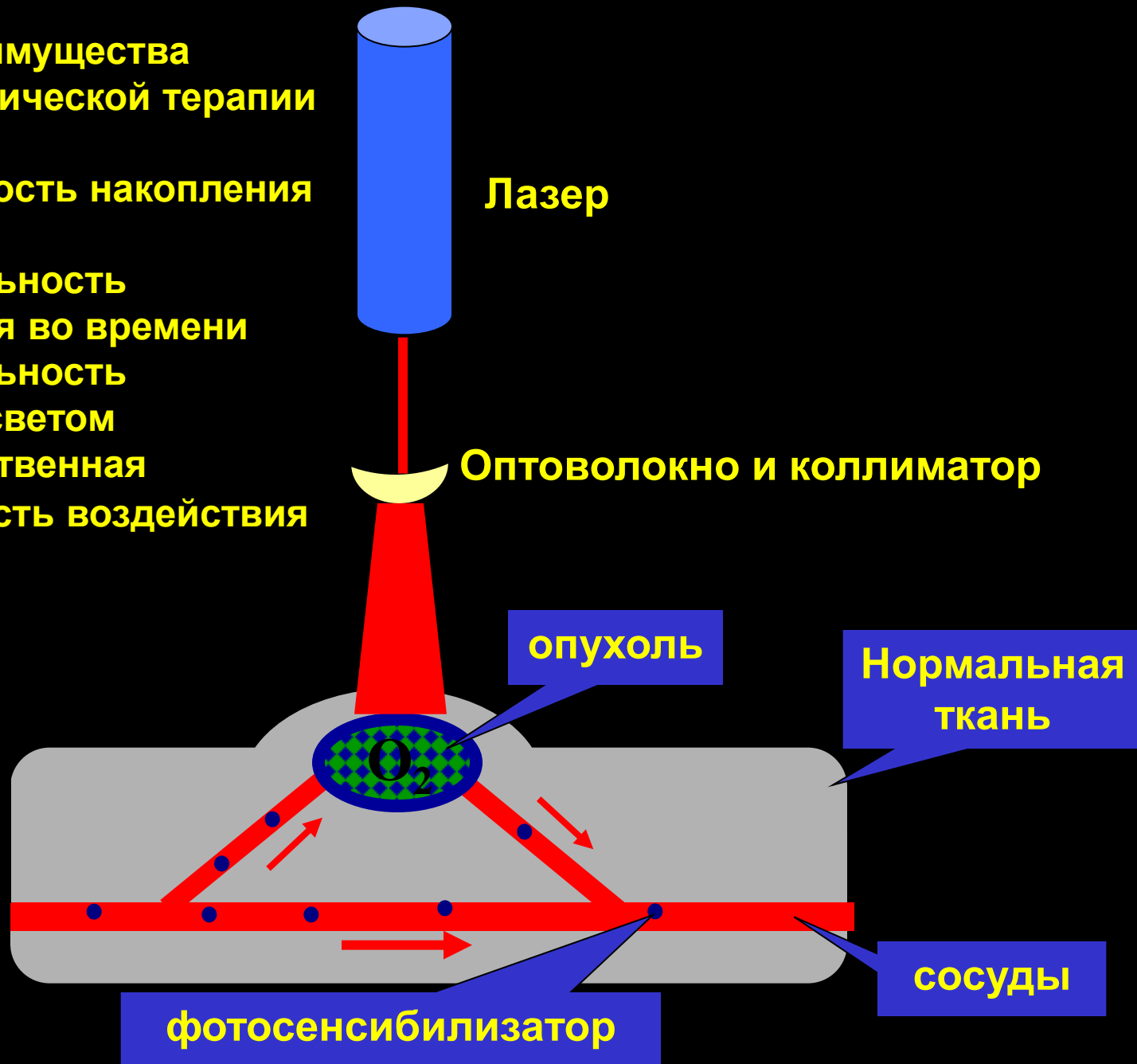
Скрининг циклоимидных производных хлорина р6, как фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии рака

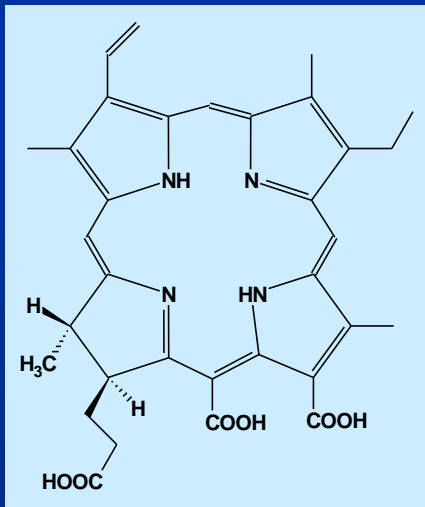
Задачи исследования

- Разработать эффективный фотосенсибилизатор (ФС) для ближней ИК-области, свойства которого превосходят хлорин р6 и ФС первого поколения**
- Исследовать механизмы функциональной активности этих ФС, взаимосвязи между структурой и активностью ФС, мишени действия ФС в клетках и тканях**

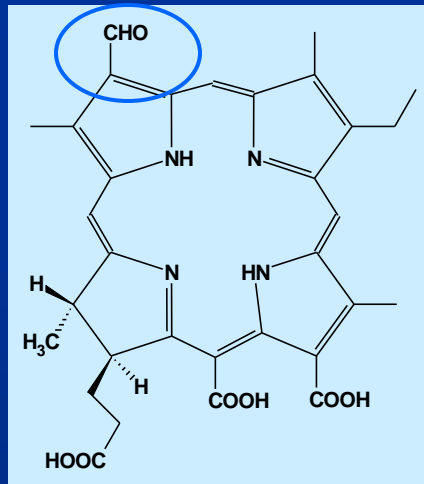
Преимущества фотодинамической терапии

- селективность накопления в опухоли
- избирательность воздействия во времени
- избирательность активации светом
- пространственная селективность воздействия

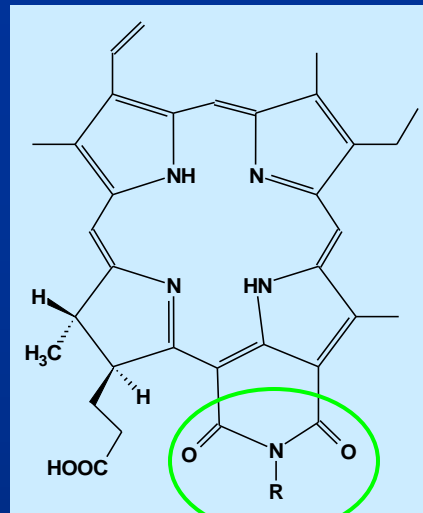




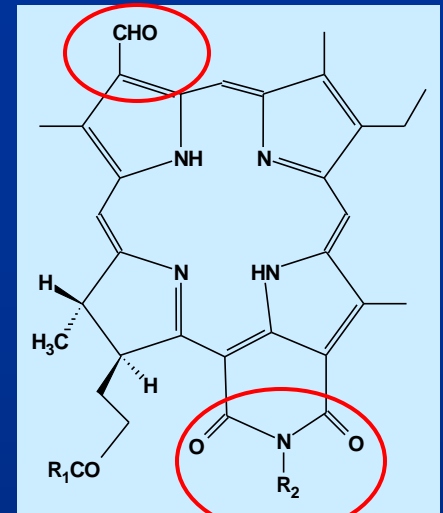
хлорин рб



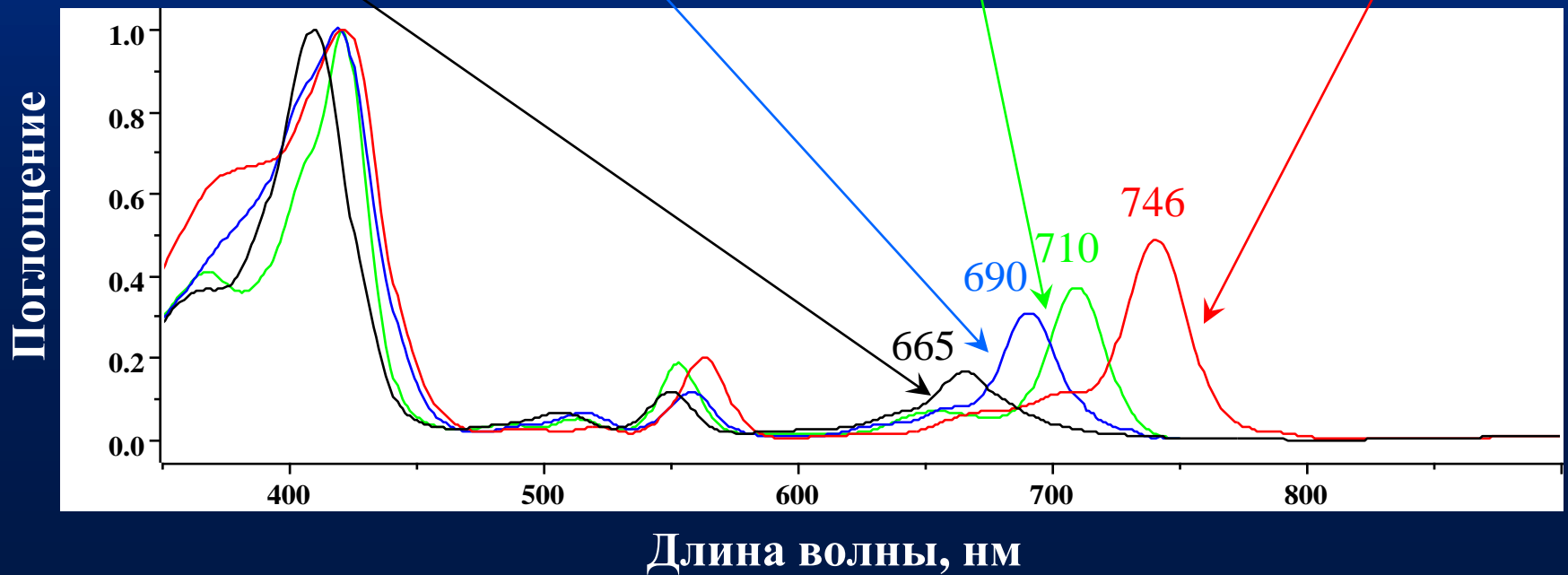
3-формил-3-дезвинил хлорин рб



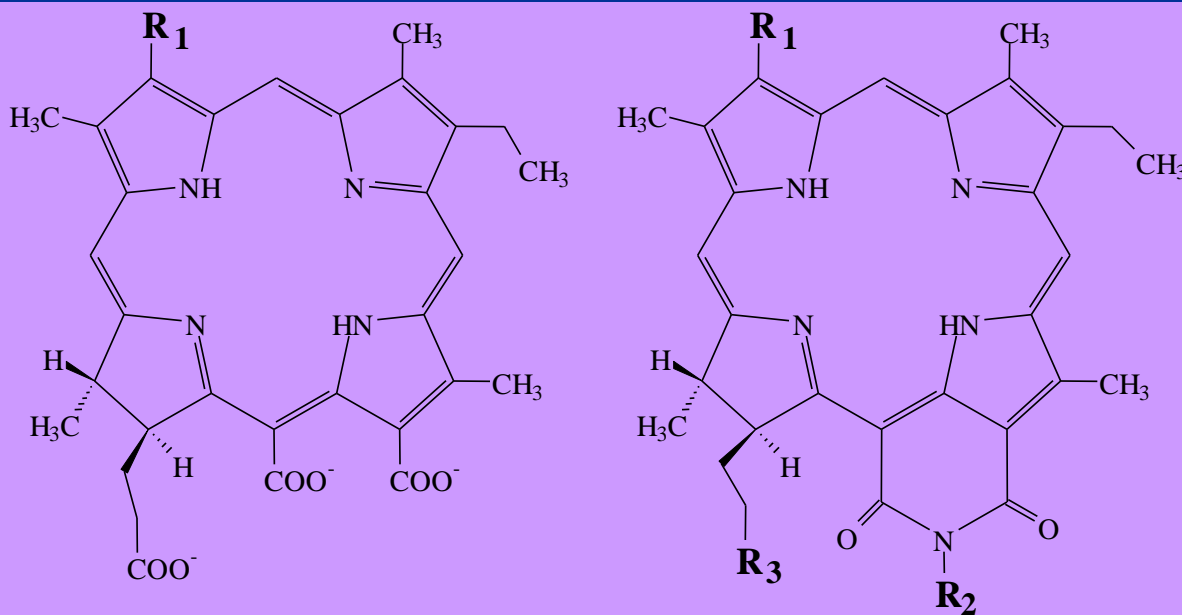
13,15-N-циклоимид хлорина рб



3-формил-3-дезвинил-13,15-N-циклоимид хлорина рб



Исследованные соединения



Исходные соединения

No. R_1

1 $CH=CH_2$

2 CHO

Me = CH_3

Переменные в структуре

Наличие заряда

Наличие полярных групп

Наличие гидрофобных групп

No. R_1 R_3 R_2
удачные производные

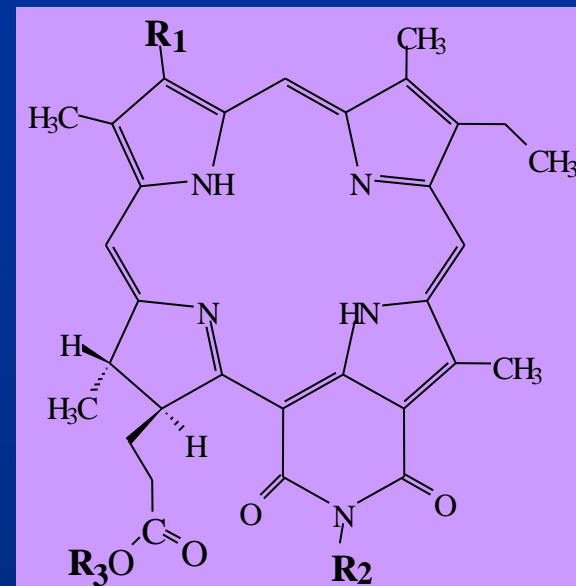
3	$CH=CH_2$	COO^-	$(CH_2)_3OH$
4	$CH=CH_2$	COO^-	$(CH_2)_2OH$
5	$CH=CH_2$	COO^-	$OCOMe$
6	$CH=CH_2$	$COOMe$	OH
7	$CH=CH_2$	$COOMe$	OMe
8	$CH=CH_2$	$COOMe$	CH_2COO^-
9	$CH=CH_2$	$COOMe$	$(CH_2)_2COO^-$
10	CHO	COO^-	$(CH_2)_3OH$
11	CHO	$COOMe$	OMe
12	$CH=NOH$	$COOMe$	OMe

неудачные производные

13	$CH=CH_2$	COO^-	CH_2COO^-
14	$CH=CH_2$	COO^-	$(CH_2)_2COO^-$
15	$CH=CH_2$	COO^-	OH
16	CHO	$COOMe$	OH
17	$CH=CHCHO$	$COOMe$	$OCOMe$
18	$CH=CHCHO$	$COOMe$	OH

Свойства в растворах

No.	R ₁	R ₂	R ₃	λ ₀ , нм	φ
1	CH=CH ₂	-	-	665	0.73
8	CH=CH ₂	CH ₂ COOH	CH ₃	708	0.60
9	CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ COOH	CH ₃	708	0.65
4	CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ OH	H	709	0.59
7	CH=CH ₂	OCH ₃	CH ₃	710	0.73
3	CH=CH ₂	(CH ₂) ₃ OH	H	711	0.66
5	CH=CH ₂	OCOCH ₃	H	711	0.35
6	CH=CH ₂	OH	CH ₃	713	0.51
12	CH=NOH	OCH ₃	CH ₃	720	0.63
11	CHO	OCH ₃	CH ₃	740	0.44
10	CHO	(CH ₂) ₃ OH	H	746	0.68



- а) нерастворимы в воде;
- б) были солюбилизированы в эмульсии кремофора
- в) связываются с липидными и мембранными структурами
- г) слабо связываются с белками
- д) не связываются с ДНК и РНК

Генерация АФК:

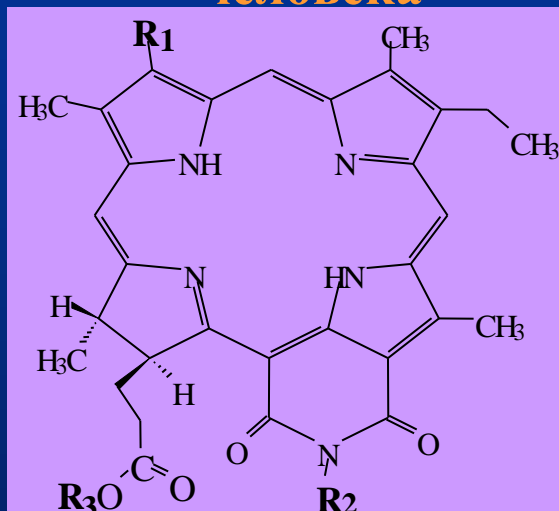
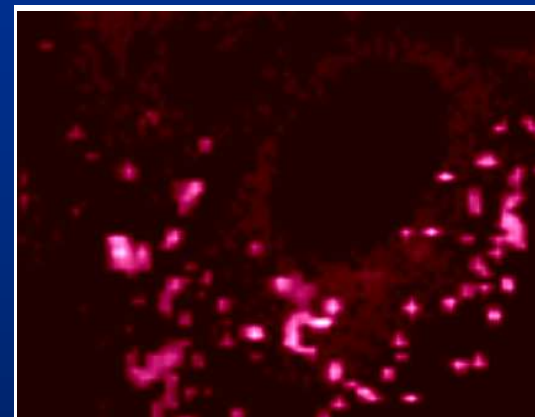
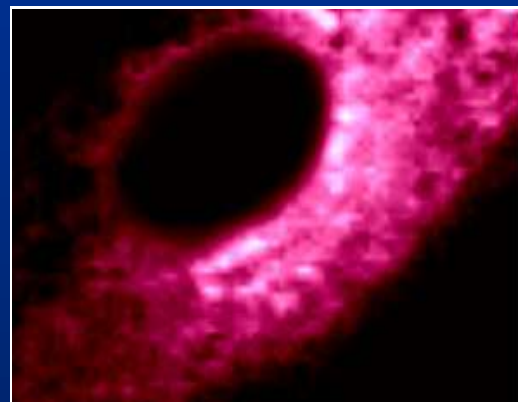
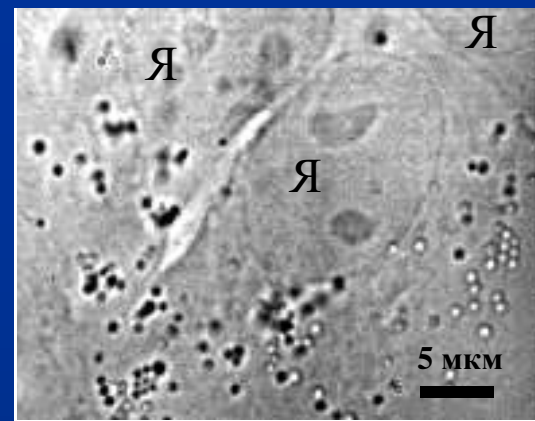
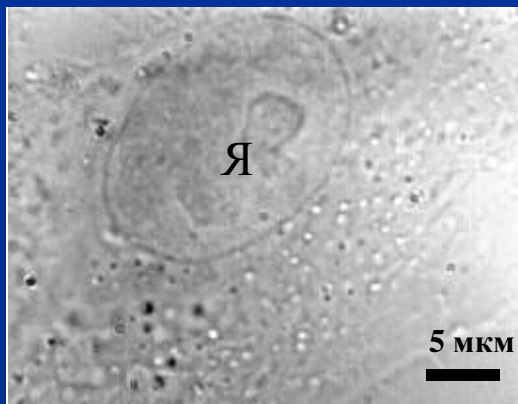
синглетный кислород – ДА
гидроксил радикалы – НЕТ

супероксид анион- зависит от окружения

Условия генерации АФК:

мономерная форма в липидном окружении

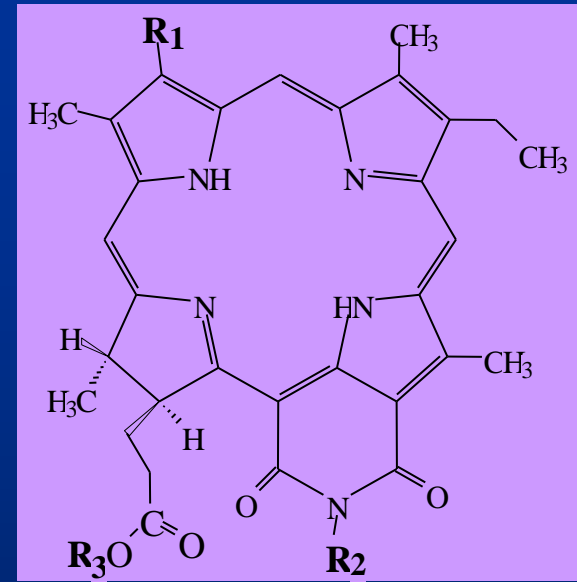
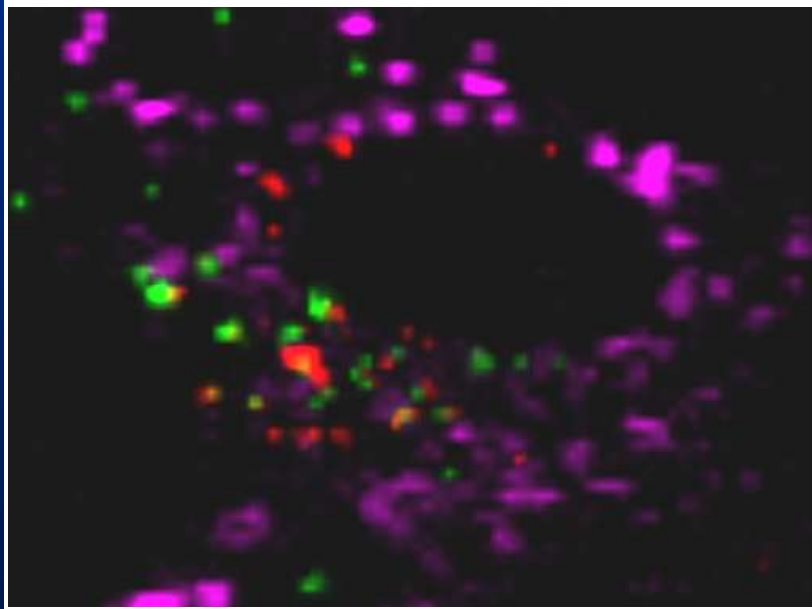
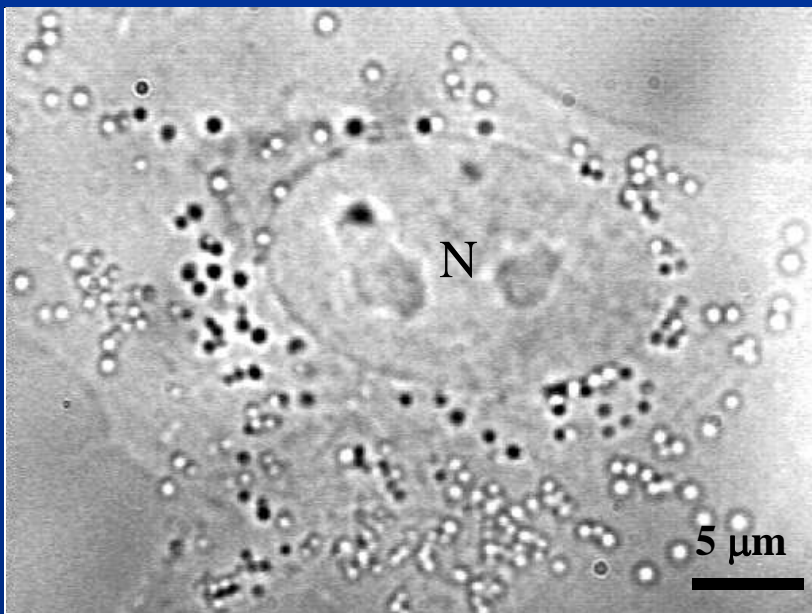
**Распределение ЦИХЛ в клетках
A549 аденокарциномы легкого
человека
и клетках HEr2 эпидермоидной
карциномы гортано-глотки
человека**



No.	R ₁	R ₂	R ₃
заряженные молекулы			
3	CH=CH ₂	(CH ₂) ₃ OH	H
4	CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ OH	H
5	CH=CH ₂	OCOCH ₃	H
9	CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ COOH	CH ₃
10	CHO	(CH ₂) ₃ OH	H
исключение			
6	CH=CH ₂	OH	CH ₃

No.	R ₁	R ₂	R ₃
нейтральные молекулы			
7	CH=CH ₂	OCH ₃	CH ₃
11	CHO	OCH ₃	CH ₃
12	CH=NOH	OCH ₃	CH ₃
исключение			
8	CH=CH ₂	CH ₂ COOH	CH ₃

Локализация ЦИХЛ в клетках A549

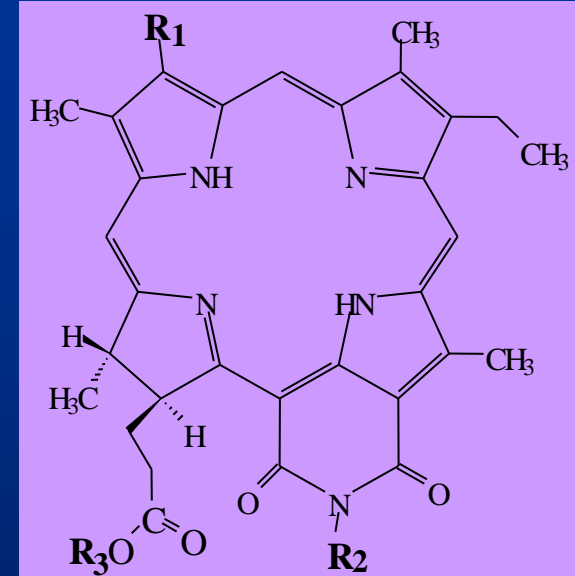
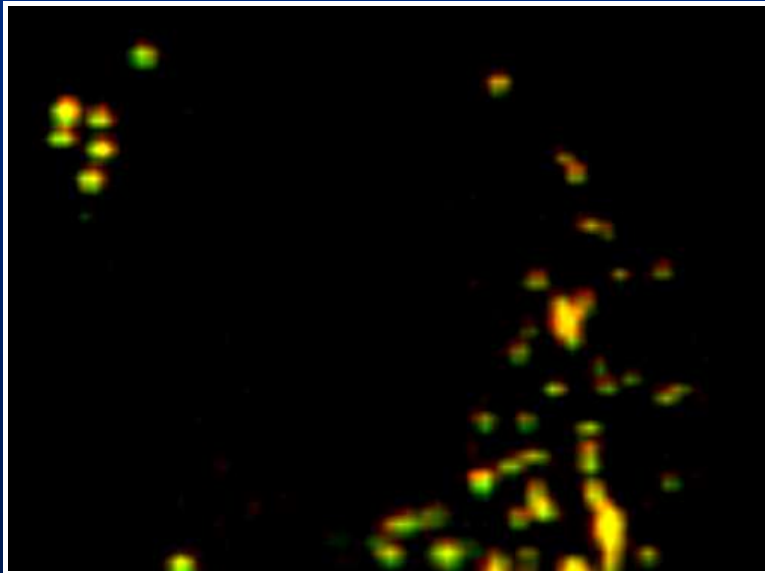
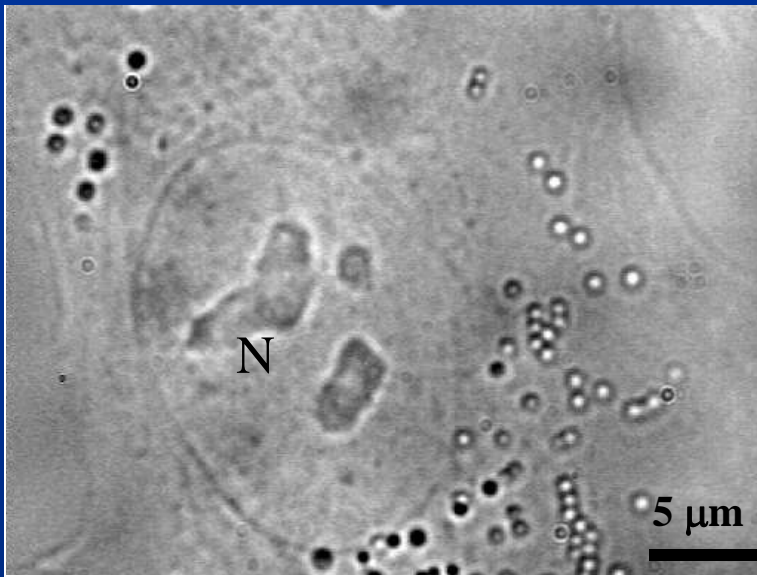


No.	R_1	R_2	R_3
7	$CH=CH_2$	OCH_3	CH_3
11	CHO	OCH_3	CH_3
12	$CH=NOH$	OCH_3	CH_3
8	$CH=CH_2$	CH_2COOH	CH_3

соединение “7”; акридин оранжевый в лизосомах;

TR-трансферин в эндосомах

Локализация ЦИХЛ в клетках A549

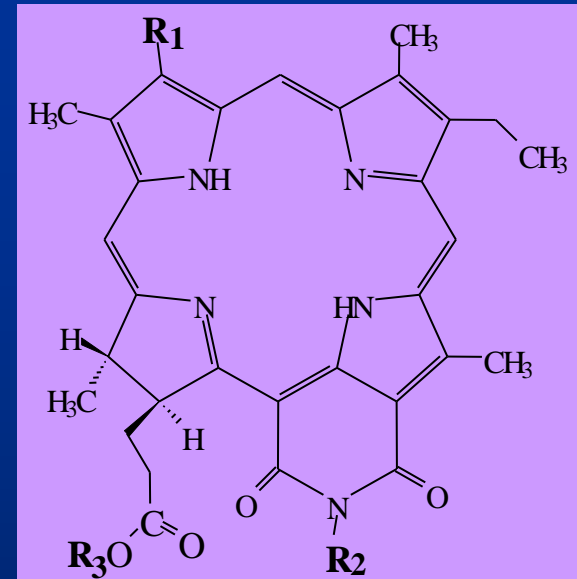
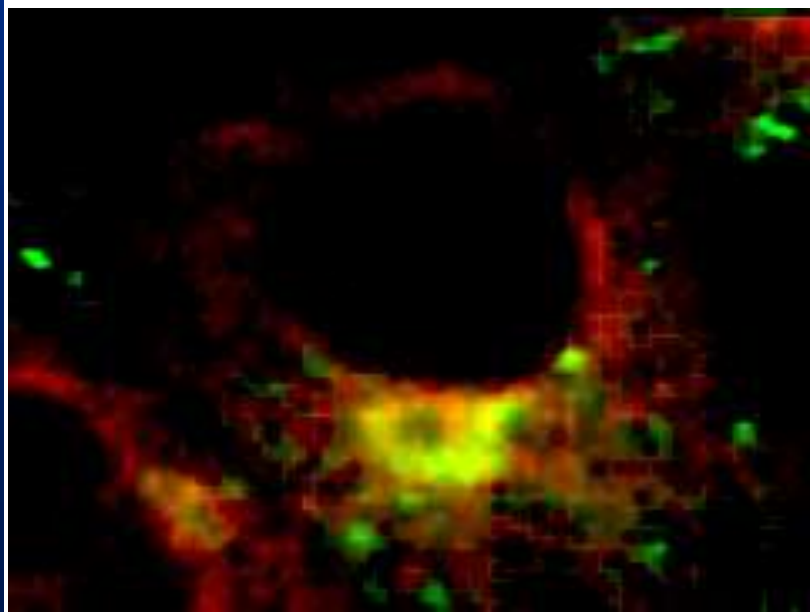
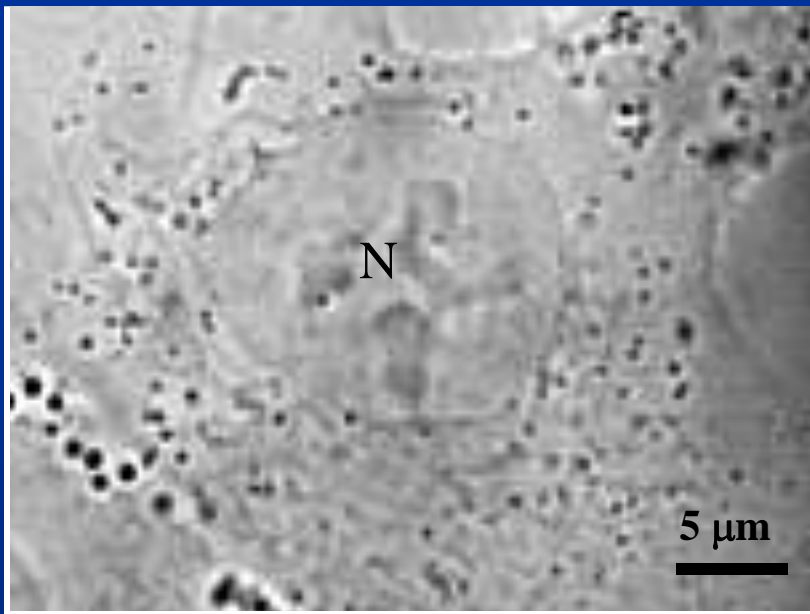


No.	R ₁	R ₂	R ₃
7	CH=CH ₂	OCH ₃	CH ₃
11	CHO	OCH ₃	CH ₃
12	CH=NOH	OCH ₃	CH ₃
8	CH=CH ₂	CH ₂ COOH	CH ₃

соединение “7”; Нильский красный в липидных каплях;

Со-локализация сигналов

Локализация ЦИХЛ в клетках A549

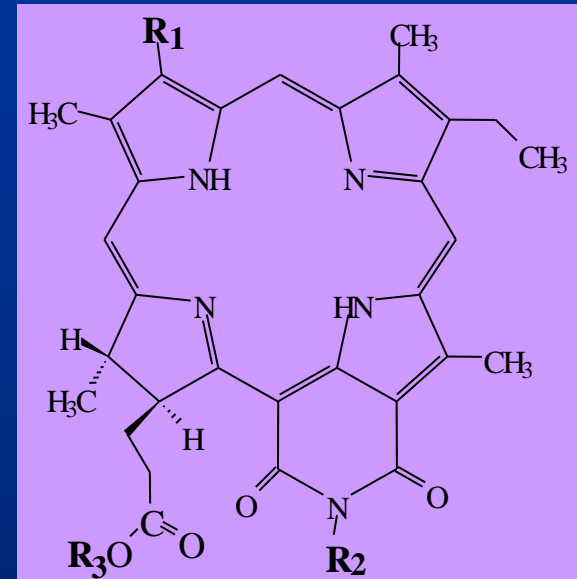
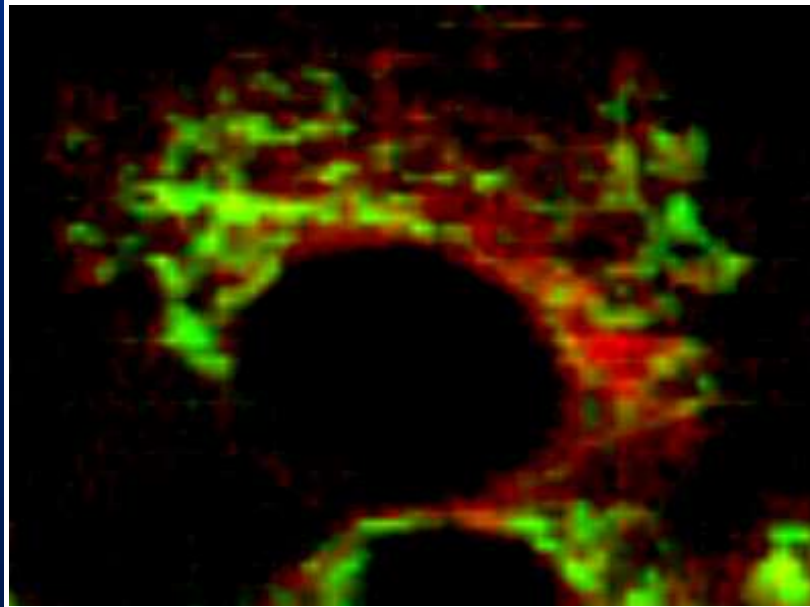
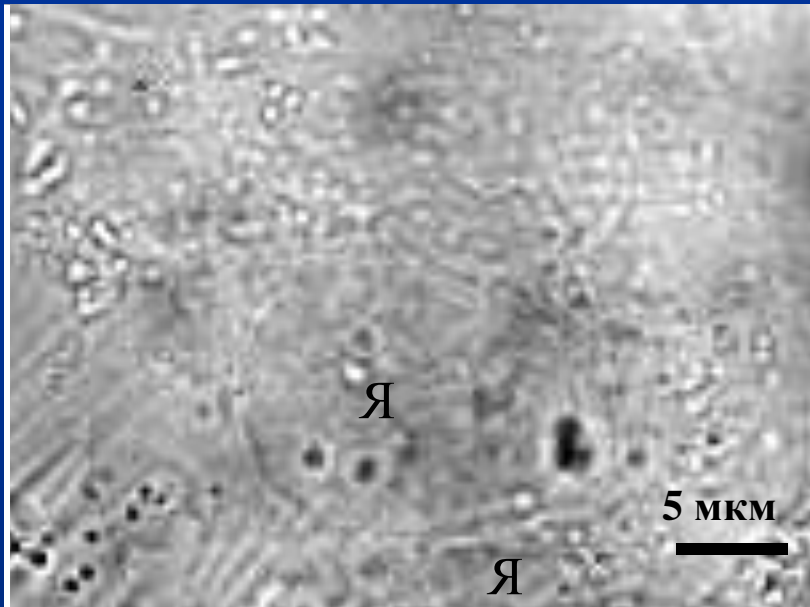


No.	R ₁	R ₂	R ₃
3	CH=CH ₂	(CH ₂) ₃ OH	H
4	CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ OH	H
5	CH=CH ₂	OCOCH ₃	H
9	CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ COOH	CH ₃
10	CHO	(CH ₂) ₃ OH	H
6	CH=CH ₂	OH	CH ₃

соединение “6” BODIPY-церамид в аппарате Гольджи

Со-локализация “6” и BODIPY-церамида в аппарате Гольджи

Локализация ЦИХЛ в клетках A549



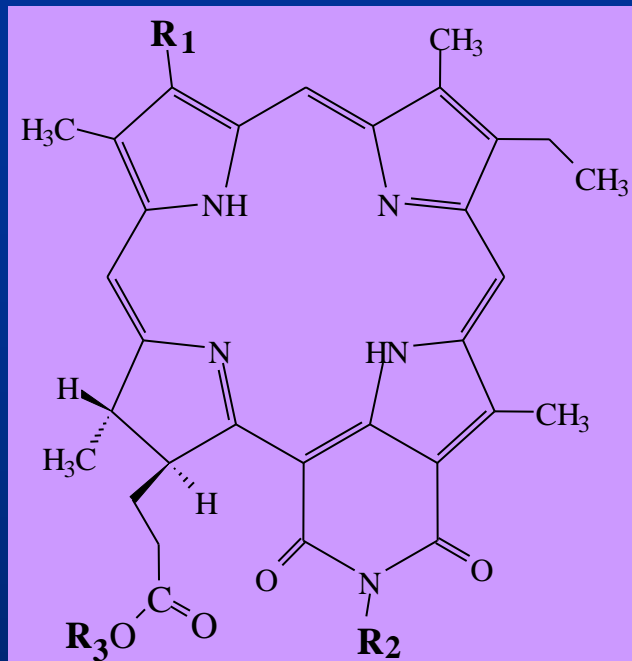
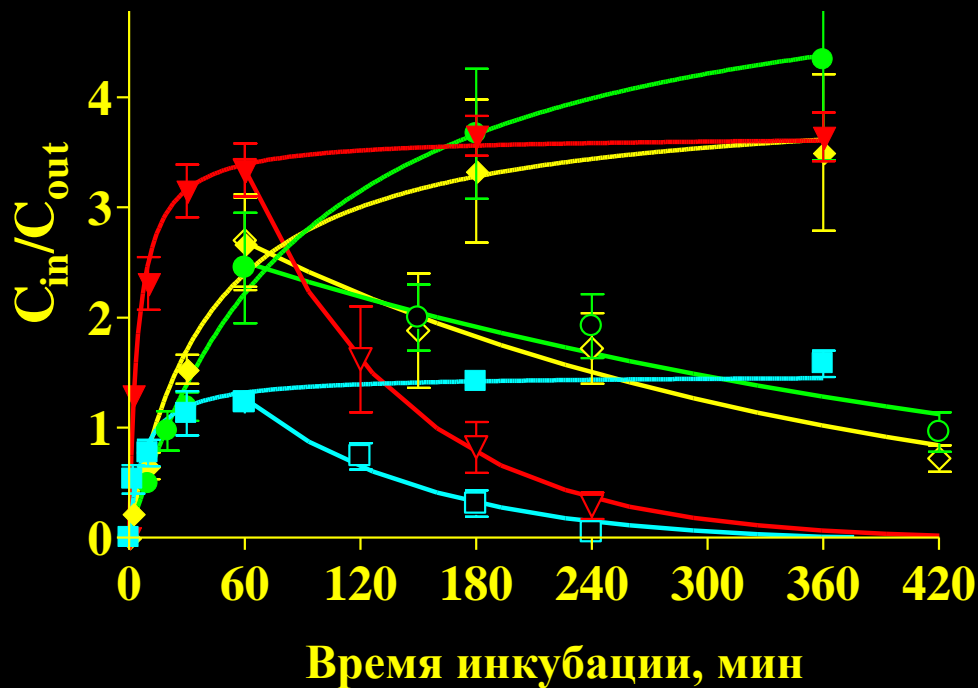
No.	R ₁	R ₂	R ₃
3	CH=CH ₂	(CH ₂) ₃ OH	H
4	CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ OH	H
5	CH=CH ₂	OCOCH ₃	H
9	CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ COOH	CH ₃
10	CHO	(CH ₂) ₃ OH	H
6	CH=CH ₂	OH	CH ₃

соединение “6” Rh123 в митохондриях

Нет со-локализации “6” и Rh123 в митохондриях

Свойства ЦИХЛ в клетках A549

сравнение накопления и удержания ЦИХЛ
в клетках



No.	R ₁	R ₂	R ₃
4	CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ OH	H
5	CH=CH ₂	OCOCH ₃	H
6	CH=CH ₂	OH	CH ₃
7	CH=CH ₂	OCH ₃	CH ₃

Вывод: скорости клеточного накопления и выведения зависят от структуры заместителей и изменяются в широких пределах

- **Временные зависимости клеточного накопления, как правило, с хорошей точностью удается описать уравнением:**

$$C_{\text{cyt}}(t) = C_{\text{ex}} K_k t / (T_{\text{up}} + t),$$

где $C_{\text{cyt}}(t)$ - средняя цитоплазматическая концентрация БАС, зависящая от времени инкубации t ; C_{ex} – концентрация БАС во внешней среде; K_k – максимальное значение отношения $C_{\text{cyt}}/C_{\text{ex}}$ при насыщении накопления; T_{up} - время инкубации, при котором C_{cyt} достигает 50% от уровня насыщения.

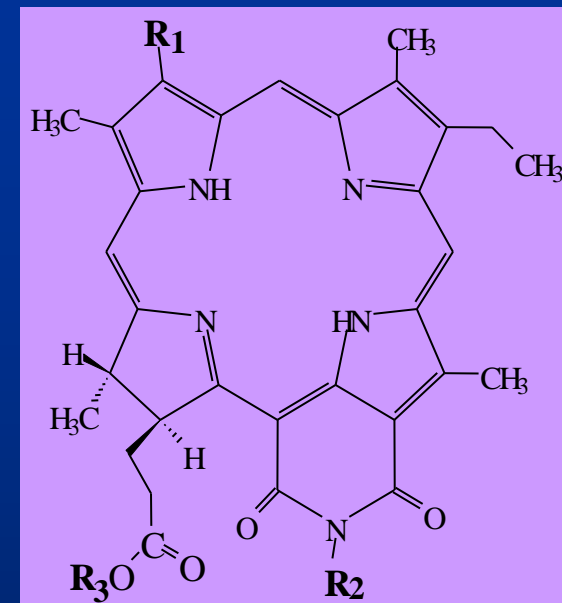
- **Данные по выведению БАС из клеток, как правило, хорошо описываются с помощью уравнения:**

$$C_{\text{cyt}}(t) = C_{\text{cyt}}(0) \exp(-\ln 2 t / T_{\text{ef}})$$

- **где $C_{\text{cyt}}(0)$ - средняя цитоплазматическая концентрация БАС в момент времени, когда БАС был удален из внешней среды; T_{ef} – время полувыведения БАС из клеток.**

Свойства ЦИХЛ в клетках A549

No.	R ₁	R ₂	R ₃	C _{in} /C _{out}	T _{up} (1/2) МИН	T _{ef} (1/2) МИН
2	CHO	-	-	0.8	100	15
3	CH=CH ₂	(CH ₂) ₃ OH	H	5.5	30	60
4	CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ OH	H	5.2	5	57
5	CH=CH ₂	OCOCH ₃	H	2.5	7	61
6	CH=CH ₂	OH	Me	9.9	87	330
7	CH=CH ₂	OCH ₃	Me	5.9	41	217
8	CH=CH ₂	CH ₂ COOH	Me	11	30	17
9	CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ COOH	Me	8	24	50
10	CHO	(CH ₂) ₃ OH	H	5.0	10	10
11	CHO	OCH ₃	Me	5.2	60	30
12	CH=NOH	OCH ₃	Me	6	90	40



быстрое накопление и очень медленно

выведение;

медленное накопление и медленное

выведение;

быстрое накопление и медленное

выведение;

быстрое накопление и быстрое

выведение

Вывод:

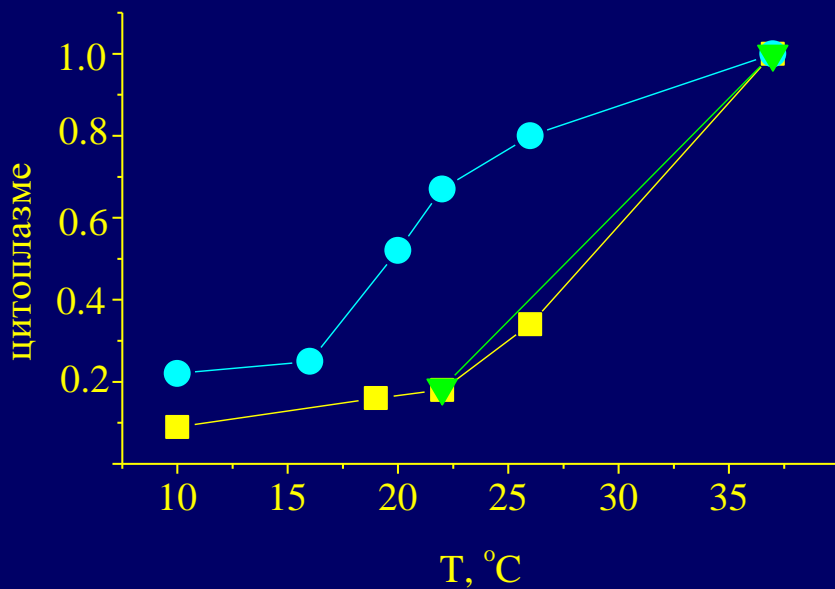
Коэффициент накопления, скорости накопления и выведения не зависят от внутриклеточной локализации ЦИХЛ.

Они зависят от заместителей

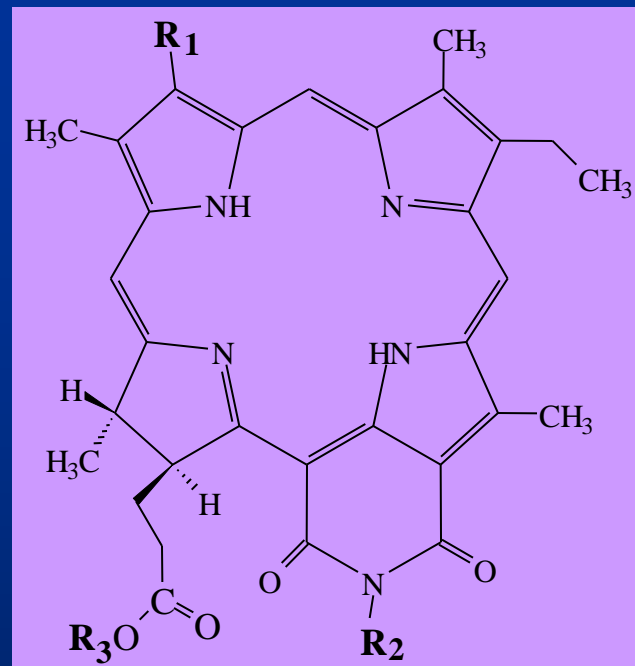
Механизмы интернализации

Накопление ЦИХЛ определяется механизмами транспорта, чувствительными к температуре

относительная концентрация в цитоплазме



мет
6
ый и
за не
КЛ



No.	R ₁	R ₂	R ₃
3	CH=CH ₂	(CH ₂) ₃ OH	H
6	CH=CH ₂	OH	CH ₃
7	CH=CH ₂	OCH ₃	CH ₃

Механизм гибели клеток под действием соединений 3, 6 и 7

зависит от дозы света и внутриклеточной концентрации ФС

Суб-фототоксичная доза (ИК₅₀) – **апоптоз**

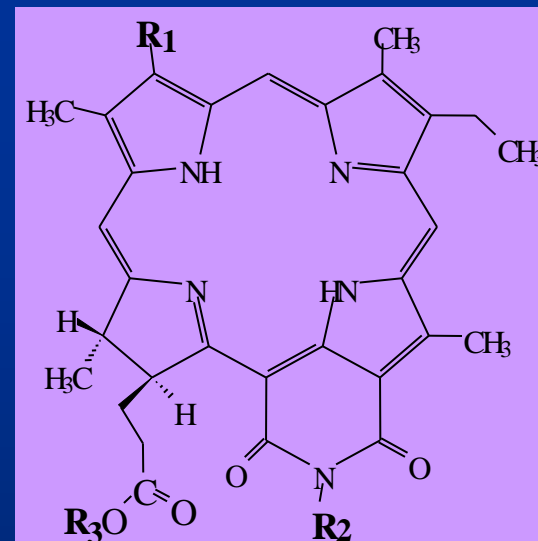
Фототоксичная доза (ИК₉₀) – **некроз**

состояние органелл

Суб-фототоксичная доза –
падение потенциала митохондрий

Фототоксичная доза –
инактивации митохондрий
разрушение лизосом

пермеабилзация клеточной мембраны



No.	R ₁	R ₂	R ₃
3	CH=CH ₂	(CH ₂) ₃ OH	H
6	CH=CH ₂	OH	CH ₃
7	CH=CH ₂	OCH ₃	CH ₃

Соединения, отобранные для исследований на ЖИВОТНЫХ

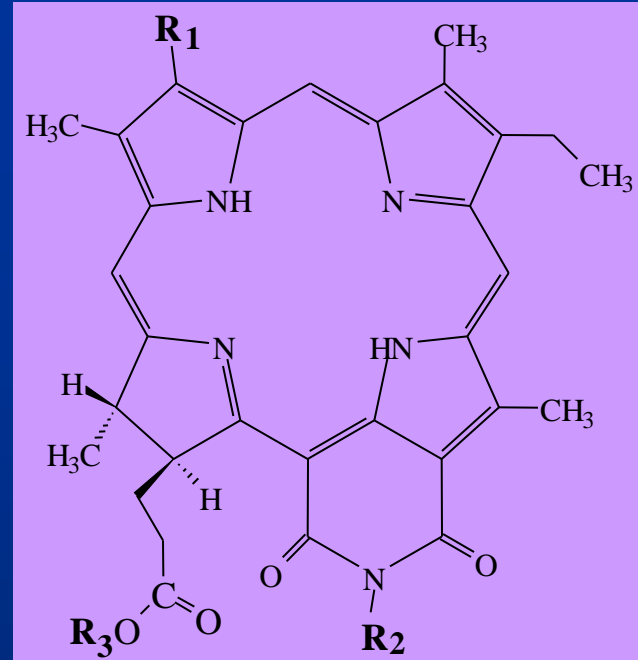
Поглощение на границе ближней ИК-области
Высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода

Улучшенное внутриклеточное проникновение
Усиленное накопление в разных клеточных органоидах, чувствительных к фотодинамическому повреждению

Варьируемые параметры клеточного накопления и выведения

Низкая темновая цитотоксичность

Высокая фотоиндуцированная цитотоксичность



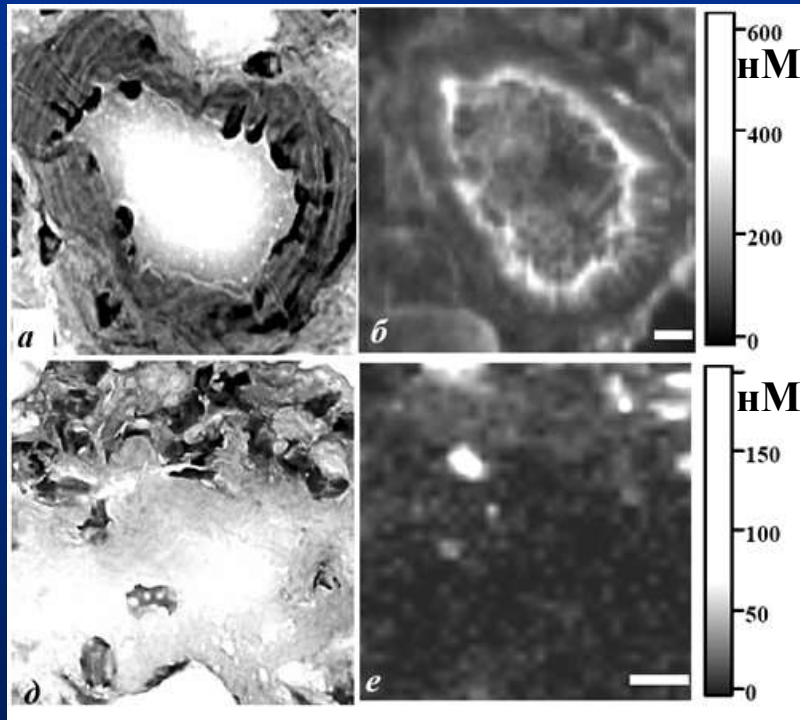
No	R ₁	R ₂	R ₃	λ _Q , нм	φ	Локализация	C _{in} /C _{out}	T _{up} мин	T _{ef} мин	ИК ₅₀ нМ
3	CH=CH ₂	(CH ₂) ₃ OH	H	711	0.66	АГ и ЭР	5.5	30	60	90
6	CH=CH ₂	OH	CH ₃	713	0.51	АГ и ЭР	9.9	87	330	30
7	CH=CH ₂	OCH ₃	CH ₃	710	0.73	ЛК	5.9	41	217	60
11	CHO	OCH ₃	CH ₃	740	0.44	ЛК	5.2	60	30	63

Хлорин р6 ИК₅₀ = 2800 нМ **улучшена в 30 - 100 раз**

Фотогем ИК₅₀ = 9000 нМ **улучшена в 100 – 300 раз**

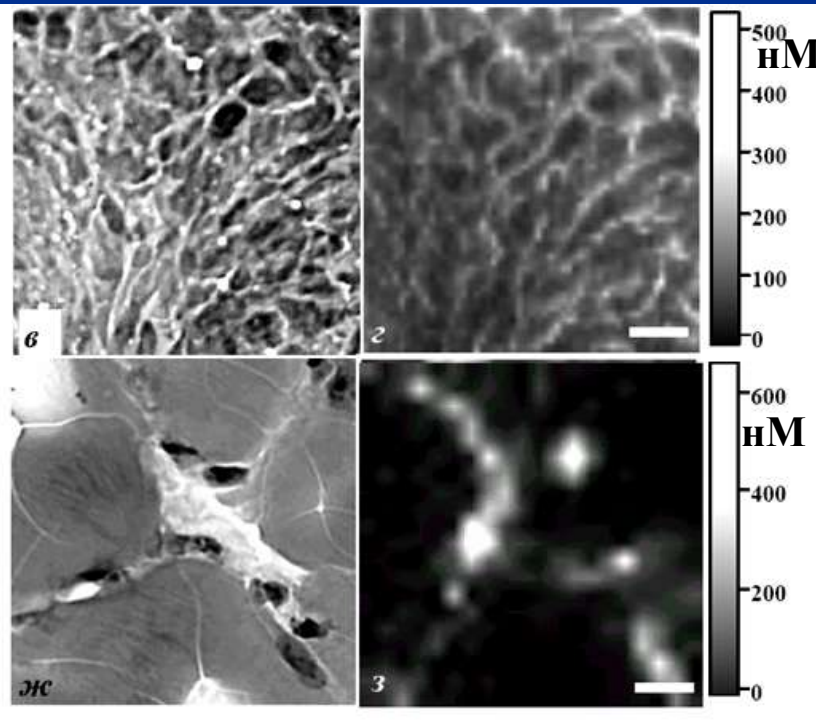
Распределение соединения 3 в срезах ткани мышц с привитой подкожно опухолью Р388

кровеносный сосуд через 15 мин
после введения соединения 3



соединительная ткань через 3 ч после
введения соединения 3

опухолевые клетки через 1,5 ч после
инъекции соединения 3

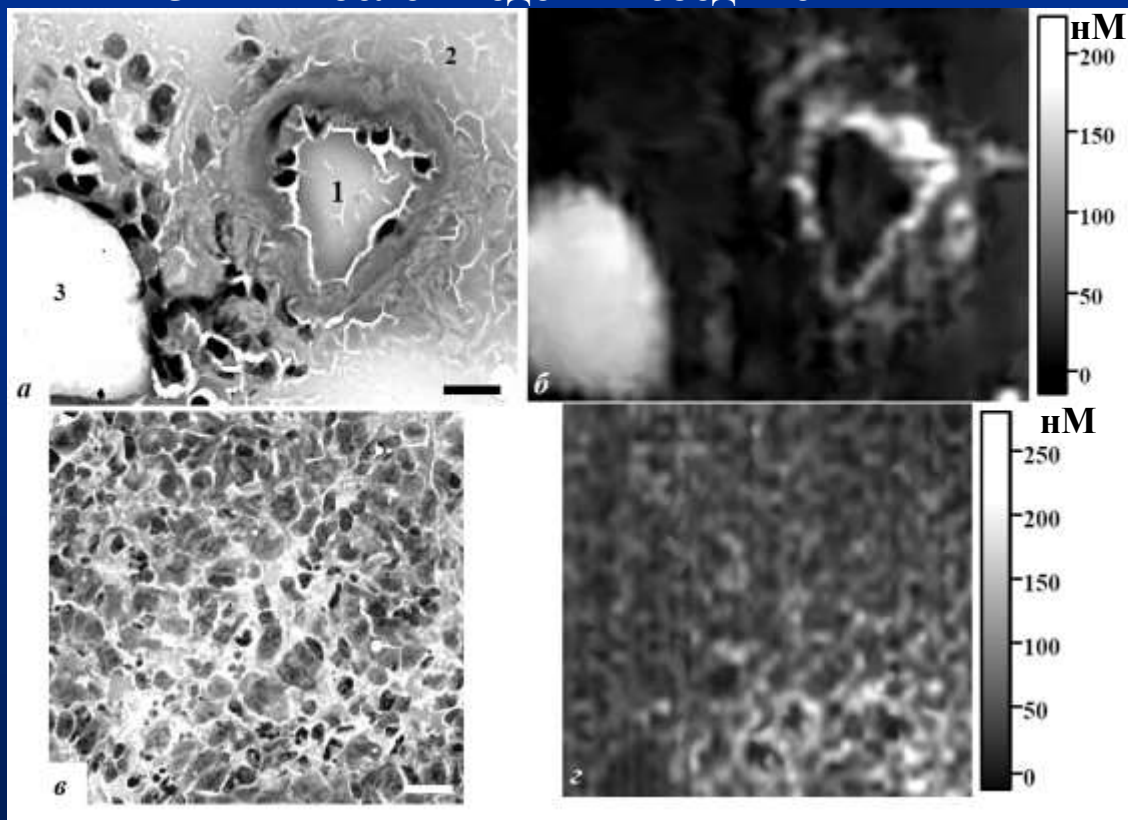


мышечная ткань через 15 мин после
введения соединения 3

Доза соединения 3 - 5 мкмоль/кг.

Распределение соединения 7 в срезах ткани мышц с привитой подкожно опухолью Р388

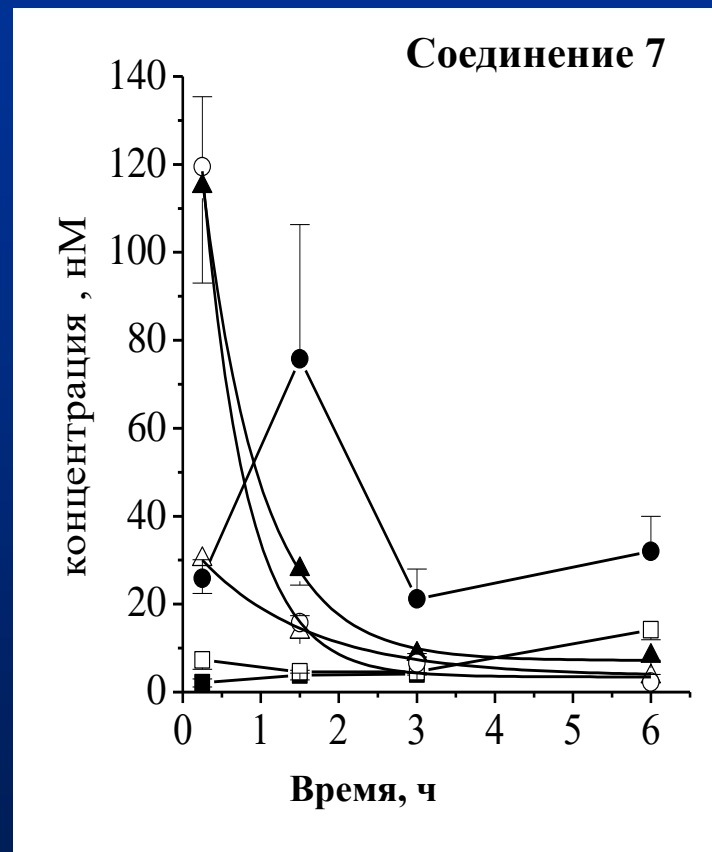
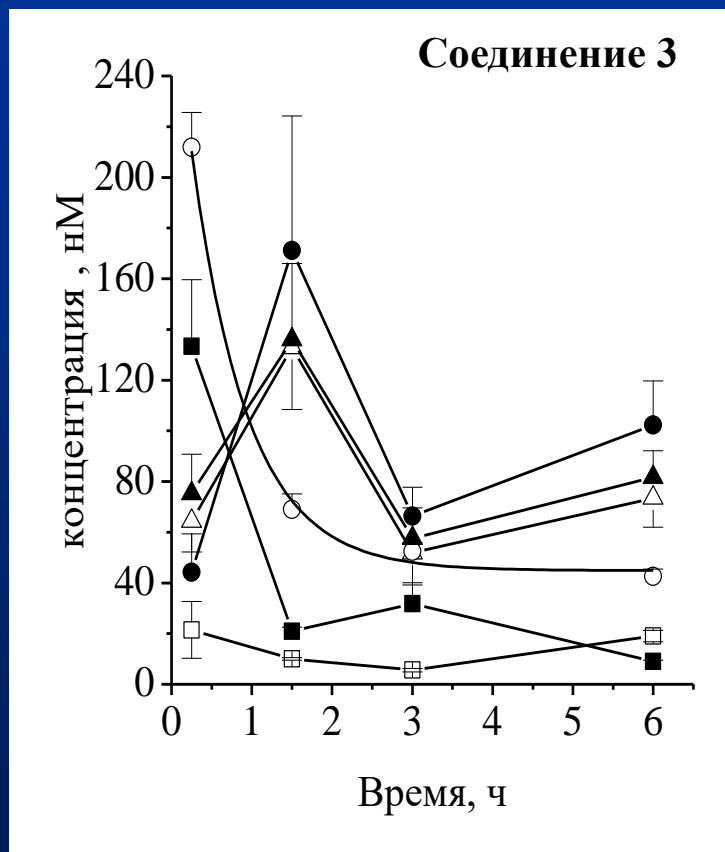
кровеносный сосуд в подкожной жировой ткани через 15 мин после введения соединения 7



опухолевые клетки через 1,5 ч после инъекции соединения 7

Доза соединения 7 - 5 мкмоль/кг.

Средние концентрации соединений 3 и 7 в опухоли и окружающих тканях при различных интервалах после внутривенного введения соединений (5 мкмоль/кг) по данным метода КОМИРСИ



опухолевые клетки (⊞), подкожная соединительная ткань, окружающая опухолевый узелок (⊞), подкожная жировая ткань (⊞), прилегающие к опухоли мышечные волокна (⊞), кожа (□), стенки кровеносных сосудов (⊞)

Процент животных с излеченной первичной опухолью на 14-й день после ФДТ при различных дозах ЦИХЛ и интервалах между инъекцией и облучением (данные МНИОИ им. П.А. Герцена).

Доза, мкмоль/кг	интервал между инъекцией и облучением				
	15 мин	45 мин	1,5 ч	3 ч	6 ч
соединение 3					
0,5	33 (6*)				
1	50 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (6)	
2		43 (7)	14 (7)	9 (11)	0 (6)
4		67 (6)	67 (6)	36 (14)	0 (6)
8				58 (12)	8 (12)
соединение 7					
4	0 (6)	17 (12)	58 (12)	0 (8)	

* Общее число животных в опыте