

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЦИСПЛАТИНА НА УРОВЕНЬ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И pH В КЛЕТКАХ ЛИНИИ HELA KYOTO С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМЫХ СЕНСОРОВ

УДК 517.21:575:618.146–006.6

Поступила 13.10.2013 г.

© **А.С. Белова**, аспирант кафедры биофизики¹;
Н.М. Мишина, к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории молекулярных технологий²;
 научный сотрудник лаборатории флюоресцентного биоимиджинга НИИ биомедицинских технологий³;
А.Г. Орлова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории биофотоники⁴;
Е.А. Сергеева, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник лаборатории биофотоники⁴;
А.В. Масленникова, д.м.н., профессор кафедры онкологии³;
А.А. Брилкина, к.б.н., доцент кафедры биохимии и физиологии растений¹;
Н.М. Шахова, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биофотоники⁴;
В.В. Белоусов, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярных технологий²;
 старший научный сотрудник лаборатории флюоресцентного биоимиджинга НИИ биомедицинских технологий³;
С.А. Лукьянов, д.б.н., академик РАН, проректор по науке⁵; зав. лабораторией флюоресцентного биоимиджинга
 НИИ биомедицинских технологий³

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

²Институт биоорганической химии РАН им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, 117997, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

³Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603000, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

⁴Институт прикладной физики РАН, Н. Новгород, 603950, ул. Ульянова, 46;

⁵Российский национальный исследовательский медицинский университет им Н.И. Пирогова, Москва, 117997, ул. Островитянова, д. 1

Цель исследования — изучение динамики уровня пероксида водорода и уровня pH в цитоплазме клеток карциномы шейки матки HeLa Kyoto при воздействии цитотоксического препарата с использованием генетически-кодированных сенсоров пероксида водорода и pH.

Материалы и методы. В работе использованы две клеточные линии карциномы шейки матки человека HeLa Kyoto, содержащие в цитоплазме генетически-кодированный сенсор пероксида водорода HyPer2 и сенсор pH HyPer2-C199S. Для оценки токсического действия цисплатина в отношении клеток HeLa Kyoto применяли стандартный МТТ-тест. Изменения уровня pH и пероксида водорода (H₂O₂) определяли методом флюоресцентной микроскопии по изменению соотношения между интенсивностями флюоресценции при возбуждении сенсора на двух длинах волн: 500 и 420 нм (F500/F420). Во время эксперимента клетки содержали в микроинкубаторе при температуре 37,0°C в бескарбонатной бессывороточной среде MEM. Раствор цисплатина в конечной концентрации, соответствующей IC₅₀ (по данным проведенного МТТ-теста), добавляли непосредственно в среду культивирования. В качестве контроля использовали среду MEM без добавления цисплатина.

Результаты. Добавление цисплатина не вызывало изменений уровня пероксида водорода и pH в цитоплазме клеток линии HeLa Kyoto, экспрессирующих соответствующие сенсоры, в течение всего времени наблюдения (20 мин).

Заключение. Использование генетически-кодированных сенсоров позволяет продемонстрировать, что при воздействии цисплатина изменений уровня пероксида водорода и pH в клетках HeLa Kyoto не происходит.

Ключевые слова: цисплатин; генетически-кодированный сенсор; пероксид водорода; флюоресцентная микроскопия; линия клеток карциномы HeLa Kyoto; МТТ-тест.

Для контактов: Белова Анастасия Сергеевна, тел. +7 906-359-88-85; e-mail: belova-as@mail.ru

The Study of Cisplatin Effect on Hydrogen Peroxide and pH Level in HeLa Kyoto Cell Line Using Genetically Encoded Sensors

A.S. Belova, Postgraduate, the Department of Biophysics¹;
N.M. Mishina, PhD, Junior Research Worker, the Laboratory of Molecular Technologies²; Research Worker, Fluorescence Bioimaging Laboratory, Scientific Research Institute of Biomedical Technologies³;
A.G. Orlova, PhD, Research Worker, the Laboratory of Biophotonics⁴;
E.A. Sergeeva, PhD, Senior Research Worker, the Laboratory of Biophotonics⁴;
A.V. Maslennikova, D.Med.Sc., Professor, the Department of Oncology³;
A.A. Brilkina, PhD, Associated Professor, the Department of Plant Biochemistry and Physiology¹;
N.M. Shakhova, D.Med.Sc., Leading Research Worker, the Laboratory of Biophotonics⁴;
V.V. Belousov, PhD, Senior Research Worker, the Laboratory of Molecular Technologies²; Senior Research Worker, Fluorescence Bioimaging Laboratory, Scientific Research Institute of Biomedical Technologies³;
S.A. Lukyanov, D.Bio.Sc., Academician of Russian Academy of Sciences, Vice-Rector on Scientific Work⁵; Head of Fluorescence Bioimaging Laboratory, Scientific Research Institute of Biomedical Technologies³

¹Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky — National Research University, Gagarin Avenue, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950;

²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya St., 16/10, Moscow, Russian Federation, 117997;

³Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603000;

⁴Institute of Applied Physics of Russian Academy of Sciences, Ul'yanova St., 46, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950;

⁵Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianov St., 1, Moscow, Russia Federation, 117997

The aim of the investigation was to study the changes of hydrogen peroxide level and pH level in cytoplasm of cervical cancer cells HeLa Kyoto on cytotoxic exposure using genetically encoded sensors of hydrogen peroxide and pH.

Materials and Methods. In the study we used two cell lines of human cervical cancer HeLa Kyoto containing in cytoplasm a genetically encoded sensor of hydrogen peroxide HyPer2 and a sensor pH HyPer2-C199S. To assess toxic effect of cisplatin on HeLa Kyoto cells we used a standard MTT assay. The changes of pH and hydrogen peroxide (H₂O₂) level were determined using fluorescence microscopy by modification in proportion between fluorescence intensities at sensor's excitation at two wavelengths: 500 and 420 nm (F500/F420). During the experiment the cells were kept in incubator at 37.0°C in carbonate-free and serum-free medium MEM. Cisplatin solution at final concentration corresponding to IC₅₀ according to MTT assay was added directly in culture medium. MEM with no cisplatin added was used as a control medium.

Results. Addition of cisplatin resulted in no changes in hydrogen peroxide and pH level in cytoplasm of HeLa Kyoto cells expressing corresponding sensors during the whole period of observation (20 min).

Conclusion. The use of genetically encoded sensors enables to demonstrate cisplatin to have no effect on hydrogen peroxide and pH level in HeLa Kyoto cells.

Key words: cisplatin; genetically encoded sensor; hydrogen peroxide; fluorescence microscopy; carcinoma HeLa Kyoto cell line; MTT assay.

Химиотерапия (цитотоксическое воздействие на опухоль) является одним из основных методов лечения злокачественных новообразований. Понимание молекулярных механизмов, вызывающих клеточную гибель при воздействии различных противоопухолевых препаратов, является исключительно важным для разработки патогенетически обоснованных методов лечения.

Цитотоксическое воздействие, по крайней мере частично, основано на повышенной чувствительности опухолевых клеток к окислительному стрессу [1], а активные формы кислорода (АФК) играют важнейшую роль в реализации эффекта противоопухолевых препаратов [1–3]. С этой точки зрения особенно актуальны исследования, посвященные изучению природы окислительного стресса, особенностям его развития в

злокачественных новообразованиях, а также возможностям воздействия на окислительный статус опухоли с целью повышения эффективности терапии.

До настоящего времени не до конца изученными остаются вопросы участия некоторых конкретных форм АФК (сайт генерации, основные мишени, пути утилизации) в развитии ответа злокачественных новообразований на различные виды противоопухолевых воздействий. Особый интерес для понимания механизмов реализации противоопухолевых эффектов лекарственных препаратов представляет пероксид водорода (H₂O₂), который является сигнальной молекулой, регулирующей пролиферацию и миграцию как нормальных, так и раковых клеток [4]. Несмотря на понимание важной роли, которую играет H₂O₂ в развитии клеточного повреждения при воздействии токсических агентов,

некоторые вопросы, в частности места образования, накопления и деградации H_2O_2 в клетках, остаются не полностью разъясненными.

В ряде работ в качестве фактора регуляции клеточной гибели наряду с АФК рассматриваются изменения уровня внутриклеточного pH. Участие изменений уровня pH доказано в процессах злокачественной трансформации, роста, инвазии клеток, неоангиогенезе, метастазировании, а также в формировании множественной лекарственной устойчивости [5]. Кроме того, существует мнение, что изменения уровня внутриклеточного pH в механизме активации гибели клетки опосредуют действие АФК [6]. Можно предположить, что под влиянием цитотоксических агентов важную роль в развитии процессов клеточной гибели могут играть изменения как содержания пероксида водорода, так и уровня внутриклеточного pH. Точный ответ на этот вопрос может быть получен при параллельном использовании высокочувствительных и специфичных сенсоров.

Цель исследования — изучение динамики уровня пероксида водорода и уровня pH в цитоплазме клеток карциномы шейки матки HeLa Kyoto при воздействии цитотоксического препарата с использованием генетически-кодируемых сенсоров пероксида водорода и pH.

Материалы и методы. В работе использованы две клеточные линии карциномы шейки матки человека HeLa Kyoto, трансфицированные генетически-кодируемыми цитоплазматическими сенсорами пероксида водорода — HyPer2 и pH — HyPer2-C199S (HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-HyPer2-C199S). HyPer представляет собой химерный белок, состоящий из двух доменов: чувствительного к H_2O_2 (регуляторный домен транскрипционного фактора OxyR из *Escherichia coli*) и флуоресцентного (так называемый круговой пермутант желтого флуоресцентного белка — c ν YFP) [7]. Сенсор HyPer2 был получен путем точечной мутации A406V (замена аланина на валин в положении 406) в структуре белка HyPer, что соответствует замене A233V в OxyR дикого типа [8]. HyPer обладает двумя пиками возбуждения (420 и 500 нм) и одним пиком эмиссии на 516 нм (рис. 1). При возрастании уровня H_2O_2 в клетках происходит пропорциональное уменьшение интенсивности флуоресценции при возбуждении в диапазоне 400–450 нм и увеличение интенсивности при возбуждении в диапазоне 450–510 нм, что регистрируется как изменение соответствующего отношения, т.е. HyPer является ратиометрическим (ratiometric) сенсором [7]. С использованием сенсора HyPer была получена информация о роли пероксида водорода в различных биологических процессах, в том числе об изменении его внутриклеточной концентрации при воздействии эпидермального фактора роста (EGF) [9].

Сенсор HyPer2-C199S был получен путем точечной мутации C199S в структуре

сенсора HyPer2. Замена цистеина на серин в положении 199 препятствует образованию дисульфидных связей в структуре белка при его окислении. HyPer2-C199S нечувствителен к изменениям содержания H_2O_2 . Изменение конформации данного сенсора определяется только колебаниями уровня pH [10].

На первом этапе работы были изучены особенности цитотоксического действия цисплатина в отношении клеточных линий HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-HyPer2-C199S с целью выявления концентраций препарата, вызывающих гибель определенного количества клеток. Исследование проводили с использованием стандартного МТТ-теста, основанного на способности митохондриальных дегидрогеназ в жизнеспособных клетках конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в формазан, который кристаллизуется внутри клетки. Измерение концентрации формазана в растворе после взаимодействия с диметилсульфоксидом (ДМСО) позволяет определить количество жизнеспособных клеток, а в цитотоксических исследованиях оценить специфическую гибель клеток, индуцированную тем или иным агентом [11].

Клетки HeLa Kyoto высевали в 96-луночный планшет в количестве 3000 клеток на 1 лунку и заливали 200 мкл среды «Игла MEM» («ПанЭко», Россия), содержащей 2 ммоль глутамина и 10% FBS (HyClone, США), затем помещали в CO_2 -инкубатор на 24 ч (37,0°C, 5% CO_2). Через сутки производили замену исходной среды на среду «Игла MEM» с глутамином и 10% FBS, содержащую цисплатин. Концентрации цисплатина варьировали от 0 до 15 мкг/мл. Через сутки производили смену среды на питательную среду с МТТ в количестве 10% от объема среды по 200 мкл на лунку. Планшет помещали в CO_2 -инкубатор на 4 ч, после чего среду отбирали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора ДМСО на 40 мин при постоянном помешивании. Оптическую

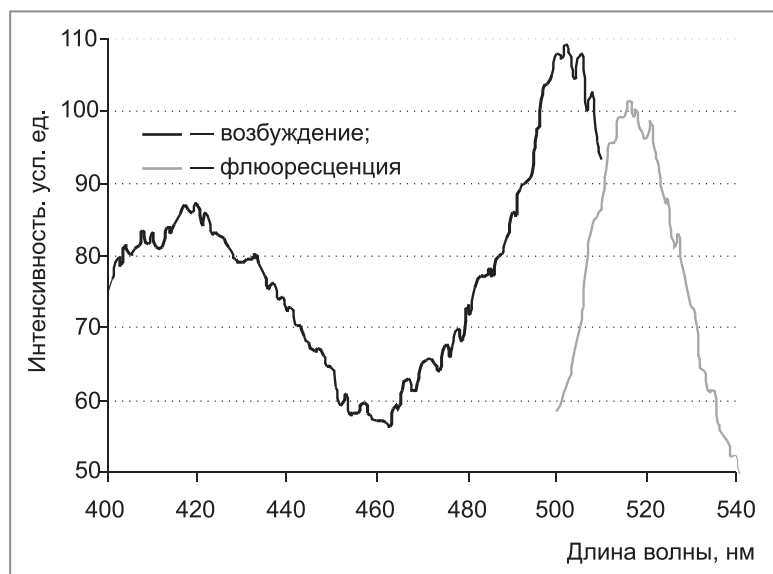


Рис. 1. Спектры возбуждения и флуоресценции сенсора HyPer (www.evrogen.com)

плотность полученного раствора формазана в ДМСО измеряли на планшетном спектрофотометре Synergy MX (BioTek, США) при длине волны 570 нм. За 100% выживаемость принимали интенсивность окраски в лунках с клетками, необработанными цисплатином. График зависимости количества выживших клеток от концентрации цисплатина усреднен по данным четырех экспериментов. Для исследования ответа клеток на воздействие цисплатина была выбрана концентрация препарата, при которой за 24 ч жизнеспособность теряют 50% клеток (IC_{50}).

На втором этапе работы был проведен анализ отклика сенсоров на добавление цисплатина. Использовали флуоресцентный инвертированный микроскоп Leica DMI6000 (Leica Microsystems GmbH, Германия). Флуоресценцию возбуждали при помощи ртутно-галогеновой лампы поочередно в двух каналах с применением фильтров 427/10 нм и 504/12 нм. Регистрацию флуоресценции осуществляли с использованием фильтра 542/27 нм. Флуоресцентные изображения регистрировали каждые 30 с в течение 20 мин. Изменение уровней пероксида водорода и pH определяли по изменению отношения F500/F420 полезных сигналов флуоресценции из цитоплазмы клеток при соответствующих длинах волн возбуждения [12]. График отношения F500/F420 для каждого варианта сенсора усреднен по данным об уровне флуоресценции 5 клеток.

Клетки высевали на чашку Петри со стеклянным дном и содержали в CO_2 -инкубаторе при температуре $37,0^{\circ}C$ в атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 2 ммоль глутамина и 10% FBS. Через сутки чашку Петри помещали на стол микроскопа в микроинкубатор при температуре $37,0^{\circ}C$. Раствор цисплатина в среде добавляли непосредственно в чашку Петри в бескарбонатном бессыво-

роточном растворе MEM (Sigma-Aldrich, США). К 1,4 мл среды в чашке добавляли 0,1 мл среды, содержащей цисплатин в конечной концентрации, соответствующей IC_{50} (по данным проведенного МТТ-теста). В качестве контроля использовали среду MEM в том же объеме без цисплатина.

Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений среднего. Обработку данных проводили в программе формирования изображений EMBL ImageJ с лицензионным программным обеспечением Excel 5.0.

Результаты. По данным МТТ-теста была построена кривая зависимости жизнеспособности клеток HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-HyPer2-C199S от концентрации цисплатина в среде (рис. 2). Для дальнейшего изучения динамики содержания H_2O_2 в клетках была выбрана концентрация цисплатина 2,937 мкг/мл, вызывающая потерю жизнеспособности 50% клеток.

По данным радиометрического мониторинга флуоресценции HyPer2, добавление цисплатина в указанной концентрации не вызывало изменения отношения F500/F420, что свидетельствует об отсутствии изменений уровня H_2O_2 в цитоплазме клеток линии HeLa Kyoto-HyPer2 по сравнению с контролем (рис. 3). Незначительный рост отношения F500/F420 непосредственно после добавления препарата наблюдали при использовании как среды MEM, так и цисплатина.

В клетках линии HeLa Kyoto-HyPer2-C199S не обнаружили каких-либо изменений соотношения интенсивности на двух пиках флуоресценции независимо от добавления среды MEM или цисплатина. Это свидетельствует о неизменении уровня внутриклеточного pH при воздействии цитотоксического препарата.

Обсуждение. Роль окислительного стресса в инициации и реализации процесса клеточной гибели, индуцированной цитотоксическими агентами на основе

платины, в настоящее время подробно изучается с помощью комплекса методов [1]. В большинстве работ описываются изменения концентрации всего пула АФК, в то время как информация о роли пероксида водорода в ответе клеток на контакт с цисплатином является неполной и противоречивой. В работе [13] авторы продемонстрировали временное повышение уровня продукции пероксида водорода при добавлении цисплатина к клеткам рака простаты. В работе [14] было показано, что пероксид водорода принимает участие в инициации клеточной гибели по механизму некроза, но не по механизму апоптоза.

Существуют данные, что изменения внутриклеточного уровня H_2O_2 и pH связаны между собой и играют важную роль в развитии процессов клеточной гибели. В частности, показано, что сдвиг баланса между

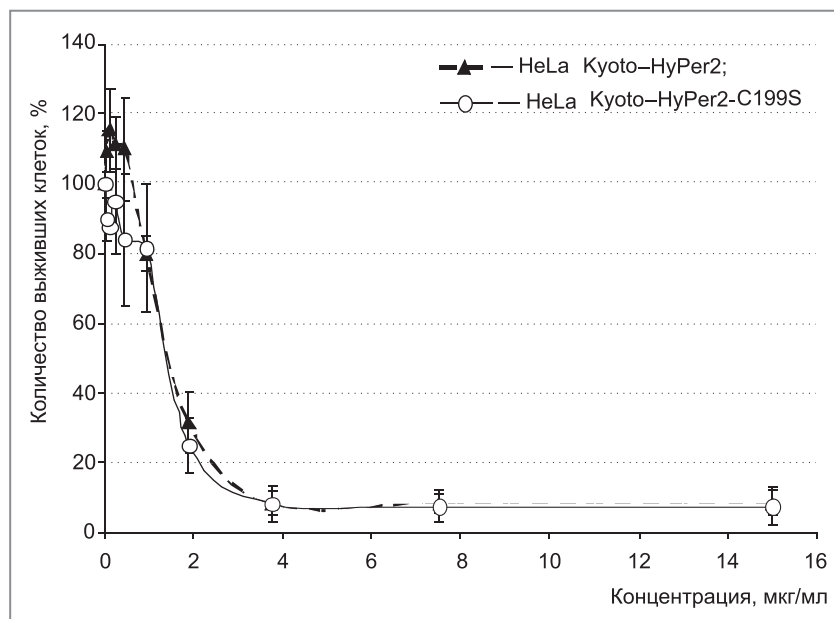


Рис. 2. Влияние концентрации цисплатина на жизнеспособность клеток линий HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-HyPer2-C199S

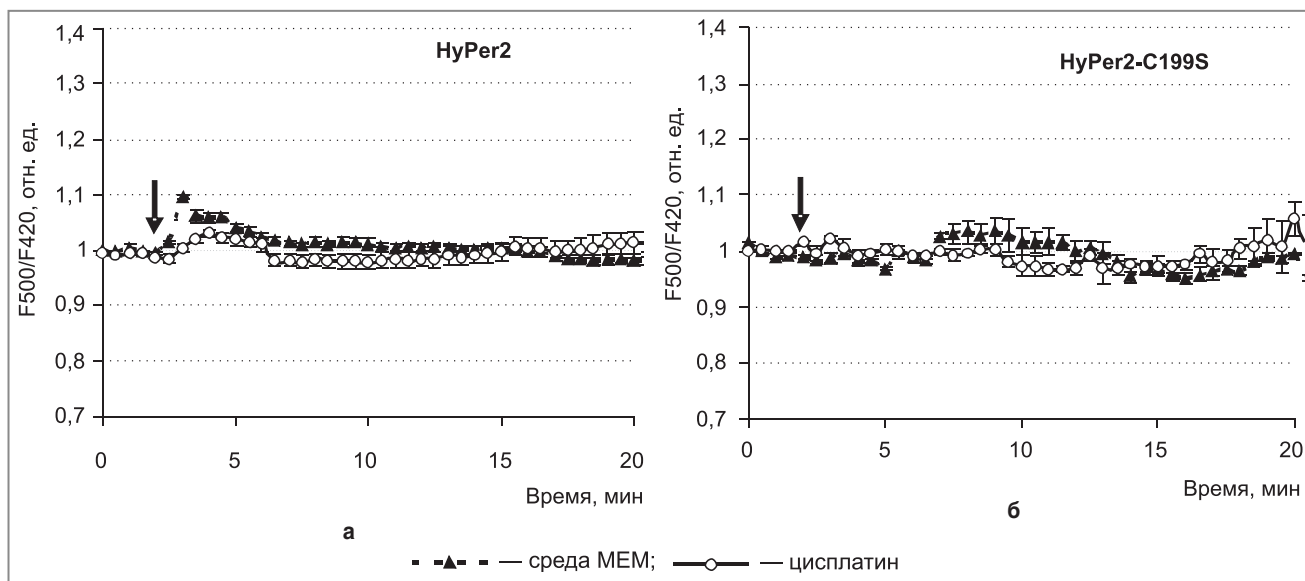


Рис. 3. Уровень H_2O_2 в цитоплазме клеток линии HeLa Kyoto-HyPer2 (а) и рН в цитоплазме клеток линии HeLa Kyoto-HyPer2-C199S (б) после добавления цисплатина (IC_{50}) и среды MEM без цисплатина. Стрелкой отмечено время добавления препарата

такими формами АФК, как пероксид водорода и супероксид анион-радикал, в сторону H_2O_2 (повышение концентрации пероксида водорода или снижение концентрации супероксид анион-радикала) приводит к активации компонентов апоптотического пути, опосредованной снижением цитоплазматического рН [6]. Кроме того, установлено, что цисплатин вызывает быстрое (в течение 5–15 мин) снижение рН в пределах 0,1 ед. в клетках рака толстого кишечника [15].

В нашем исследовании с помощью генетически-кодированных сенсоров было продемонстрировано, что контакт с цисплатином в концентрации IC_{50} не вызывает повышения уровня пероксида водорода в цитоплазме клеток линии HeLa Kyoto-HyPer2. Полученные результаты соответствуют данным работы [16], авторы которой не обнаружили повышения содержания активных форм кислорода в клетках остеосаркомы SOSN2. Также нами не были зарегистрированы изменения рН цитоплазмы в клеточной культуре HeLa Kyoto-HyPer2-C199S. Это обуславливает необходимость дальнейшего изучения механизмов индуцированной цисплатином гибели клеток линии HeLa Kyoto в зависимости от концентрации препарата.

Заключение. Использование генетически-кодированных сенсоров позволяет продемонстрировать, что при воздействии цисплатина изменений уровня пероксида водорода и рН в клетках HeLa Kyoto не происходит.

Финансирование исследования. Работа поддержана грантами в рамках программы Президиума РАН «Фундаментальные науки медицине», проекта РФФИ 13-04-97165, проекта Министерства образования и науки Российской Федерации №8147, проекта Министерства образования и науки Российской Федерации №8269, проекта Министерства образования и науки Российской Федерации №11.G 34. 31.0017.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература

1. Conklin K.A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integrative Cancer Therapies* 2004; 3(4): 294–300.
2. Manda G., Nechifor M.T., Neagu T.-M. Reactive oxygen species. *Cancer and anti-cancer therapies. Current Chemical Biology* 2009; 3: 342–366.
3. Florea A.-M., Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* 2011; 3: 1351–1371.
4. Szatrowski T.P., Nathan C.F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51: 794–798.
5. Harguindey S., Orive G., Pedraz J.L., Paradiso A., Reshkin S.J. The role of pH dynamics and the Na^+/H^+ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin — one single nature. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756(1): 1–24.
6. Pervaiz S., Clement M.V. A permissive apoptotic environment: function of a decrease in intracellular superoxide anion and cytosolic acidification. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290(4): 1145–1150.
7. Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Staroverov D.B., Shakhbazov K.S., Tersikh A.V., Lukyanov S. Genetically-encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 2006; 3(4): 281–286.
8. Марквичева К.Н. Исследование сигнальных функций пероксида водорода в процессе фагоцитоза. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М; 2010.
9. Mishina N.M., Tyurin-Kuzmin P.A., Markvicheva K.N., et al. Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? *Antioxid Redox Signal* 2011 Jan 1; 14(1): 1–7.
10. Poburko D., Santo-Domingo J., Demareux N. Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations. *The Journal of Biological Chemistry* 2011; 286(13): 11672–11684.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1–2): 55–63.
12. Mishina N.M., Markvicheva K.N., Bilan D.S., Matlashov M.E., Shirmanova M.V., Liebl D., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V.V. Visualization of intracellular hydrogen peroxide with HyPer, a genetically-encoded fluorescent probe. *Methods Enzymol* 2013; 526: 45–59.
13. Tomohiro I., Riyako T., Keitaro K., Keita N., Takashi D.,

Masashi A., Yasuyuki T., Masafumi I., Yoshinori N. Cisplatin induces production of reactive oxygen species via NADPH oxidase activation in human prostate cancer cells. *Free Radical Research* 2011; 45(9): 1033–1039.

14. Baek S.M., Kwon C.H., Kim J.H., Woo J.S., Jung J.S., Kim Y.K. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J Lab Clin Med* 2003; 142(3): 178–186.

15. Rebillard A., Tekpli X., Meurette O., Sergent O., LeMoigne-

Muller G., Vernhet L., Gorria M., Chevanne M., Christmann M., Kaina B., Counillon L., Gulbins E., Lagadic-Gossman D., Dimanche-Boitre M.-T. Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2007; 15(67): 7865–7874.

16. Katsuda H., Yamashita M., Katsura H., Yu J., Waki Y., Nagata N., Sai Y., Miyamoto K. Protecting cisplatin-induced nephrotoxicity with cimetidine does not affect antitumor activity. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(11): 1867–1871.