

# ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК ЛИНИИ HELA KYOTO, ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ СЕНСОРОМ HYPER2, К ДЕЙСТВИЮ ЦИСПЛАТИНА

УДК 61:591.185

Поступила 30.05.2014 г.



**А.С. Белова**, аспирант кафедры биофизики<sup>1</sup>;

**А.Г. Орлова**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории биофотоники<sup>2</sup>; старший научный сотрудник лаборатории фемтосекундной биофотоники<sup>1</sup>;

**А.А. Брилкина**, к.б.н., доцент кафедры биохимии и физиологии растений<sup>1</sup>;

**А.В. Масленникова**, д.м.н., профессор кафедры онкологии<sup>3</sup>; профессор кафедры биомедицины<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Институт прикладной физики РАН, Н. Новгород, 603950, ул. Ульянова, 46;

<sup>3</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1

**Цель исследования** — с использованием МТТ-теста провести сравнение цитотоксического действия цисплатина в отношении клеток линии HeLa Kyoto и линии HeLa Kyoto, содержащей генетически-кодируемый сенсор пероксида водорода HyPer2 (линия HeLa Kyoto–HyPer2), и с помощью метода окрашивания трипановым синим выявить дозы цисплатина, вызывающие гибель клеток при различных сроках воздействия.

**Материалы и методы.** Использованы клеточная линия карциномы шейки матки человека HeLa Kyoto и линия HeLa Kyoto, трансфицированная цитоплазматическим сенсором пероксида водорода HyPer2 (HeLa Kyoto–HyPer2). Анализ цитотоксического и антипролиферативного действия цисплатина в отношении данных клеток проведен с помощью МТТ-теста. Определяли жизнеспособность клеток после 24 ч инкубации с препаратом в концентрациях от 0 до 50 мкмоль/л, далее в период 0–24 ч с интервалом 2 ч — при концентрации IC<sub>50</sub>; а также после 2, 4, 6, 8 ч при концентрациях от 9,6 до 833,3 мкмоль/л подсчитывали количество живых и погибших клеток после окрашивания трипановым синим.

**Результаты.** По данным МТТ-теста построена кривая зависимости жизнеспособности клеток HeLa Kyoto и HeLa Kyoto–HyPer2 от концентрации цисплатина в среде. Установлено, что концентрация IC<sub>50</sub>, которая соответствует дозе, вызывающей потерю жизнеспособности 50% клеток, для HeLa Kyoto–HyPer2 в 1,3 раза ниже, чем для HeLa Kyoto. По результатам окрашивания витальным красителем трипановым синим выявлено, что ингибирующие эффекты цисплатина в концентрации IC<sub>50</sub> к 24 ч связаны главным образом с торможением деления клеток, а не с их гибелью. При концентрациях до 52 мкмоль/л повреждение мембран не возникает в течение 8 ч, а при сверхвысоких концентрациях — 416,7 мкмоль/л — повреждение возможно уже после 4 ч экспозиции.

**Заключение.** Сравнение чувствительности двух клеточных линий к действию цисплатина показало, что трансфекция клеток флюоресцентным белком вызывает повышение чувствительности к препарату. При воздействии на клетки HeLa Kyoto–HyPer2 препаратом в концентрации IC<sub>50</sub> в течение 24 ч наблюдается ингибирование деления клеток, а повышение концентрации препарата вызывает увеличение числа погибших клеток и снижение сроков их гибели.

**Ключевые слова:** линия клеток цервикальной карциномы; трансфицированные клетки HeLa Kyoto; генетически-кодируемый сенсор; HeLa Kyoto–HyPer2; цитотоксичность цисплатина.

## English

## The Sensitivity of HeLa Kyoto Cell Line Transfected with Sensor HyPer2 to Cisplatin

**A.S. Belova**, Postgraduate, the Department of Biophysics<sup>1</sup>;

**A.G. Orlova**, PhD, Researcher, Biophotonics Laboratory<sup>2</sup>; Senior Researcher, Femtosecond Biophotonics Laboratory<sup>1</sup>;

**Для контактов:** Орлова Анна Геннадьевна, e-mail: orlova@ufp.appl.sci-nnov.ru

**A.A. Brilkina**, PhD, Associate Professor, the Department of Biochemistry and Plant Physiology<sup>1</sup>;  
**A.V. Maslennikova**, D.Med.Sc., Professor, the Department of Oncology<sup>2</sup>; Professor, the Department of Biomedicine<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod — National Research University, Prospekt Gagarina, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950;

<sup>2</sup>Institute of Applied Physics of Russian Academy of Sciences, Ul'yanova St., 46, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950;

<sup>3</sup>Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005

**The aim of the investigation** is to compare by means of MTT-assay cytotoxic effect of cisplatin on the cells of HeLa Kyoto line and HeLa Kyoto line containing genetically-encoded sensor of hydrogen peroxide HyPer2 (HeLa Kyoto–HyPer2 line), and using staining by trypan blue to identify the doses of cisplatin causing cell death at different exposure time.

**Materials and Methods.** A HeLa Kyoto cell line of human cervical carcinoma and HeLa Kyoto line transfected with the cytoplasmic sensor of hydrogen peroxide (HeLa Kyoto–HyPer2) were used in the study. The analysis of cytotoxic and antiproliferative action of cisplatin in relation to the given cells was performed using MTT-assay. Cell viability was determined after 24 h of incubation with the preparation at concentrations from 0 to 50  $\mu\text{mol/L}$ , then within the period from 0 to 24 h with an interval of 2 h at concentration of  $\text{IC}_{50}$ ; and also after 2, 4, 6, 8 h at concentrations from 9.3 to 833.3  $\mu\text{mol/L}$  a quantity of live and destructed cells was counted using staining by trypan blue.

**Results.** After cisplatin expose the dose-response curves for cell viability of HeLa Kyoto and HeLa Kyoto–HyPer2 cell lines were built according to MTT-assay data. It was established that concentration of  $\text{IC}_{50}$  corresponding to the dose causing a loss of viability of 50% of cells is 1.3 times lower for HeLa Kyoto–HyPer2 compared to HeLa Kyoto. The results of staining by a vital agent trypan blue showed that inhibiting effects of cisplatin in concentration of  $\text{IC}_{50}$  by 24 h are mainly linked with the delay of cell division but not with their death. At concentrations up to 52  $\mu\text{mol/L}$  damage of the membranes does not occur during 8 h, and at superhigh concentrations — 416.7  $\mu\text{mol/L}$  — the damage is possible already 4 h after the exposure.

**Conclusion.** Comparison of sensibility of the two cell lines to the effect of cisplatin showed that transfection of the cells with the fluorescent protein results in the increase of the sensitivity to cisplatin. When HeLa Kyoto–HyPer2 cells are exposed to the preparation at concentration of  $\text{IC}_{50}$  during 24 h, inhibition of cell division is observed; higher concentrations of the preparation cause increase of the number of dead cells and diminish the terms of their destruction.

**Key words:** cervical carcinoma cell line; transfected HeLa Kyoto cells; genetically-encoded sensor; HeLa Kyoto–HyPer2; cisplatin cytotoxicity.

Цисплатин — химиотерапевтический препарат, используемый в клинической практике для лечения широкого ряда злокачественных новообразований. Он вызывает повреждения ДНК [1], а также индуцирует продукцию активных форм кислорода (АФК), инициирующих гибель опухолевой клетки [2, 3]. В настоящее время с целью оценки участия конкретных форм АФК в реакции клетки на разнообразные внешние воздействия, в том числе терапевтические, все шире используются генетически-кодируемые сенсоры на основе флуоресцентных белков [4–9]. Преимуществами данных сенсоров являются высокая специфичность и возможность длительных динамических исследований. Тем не менее в случае изучения цитотоксических эффектов лекарств в отношении трансфицированных клеточных линий важно учитывать возможность влияния чужеродных белков, присутствующих в клетках, на их чувствительность к действию применяемых препаратов [10, 11]. Для этого необходимо осуществлять сравнительную оценку цитотоксического действия химиотерапевтических агентов в отношении трансфицированных и исходных клеточных линий.

Кроме того, в механизме действия цисплатина продемонстрирован ряд дозозависимых эффектов, таких как влияние на пути клеточной гибели, сигнальные каскады, гликолитическая активность и др. [12, 13], поэтому важным аспектом при изучении механизмов воздействия цитотоксического агента является выбор оптимальных рабочих доз препарата.

**Цель исследования** — с использованием МТТ-теста провести сравнение цитотоксического действия цисплатина в отношении клеток линии HeLa Kyoto и линии HeLa Kyoto, содержащей генетически-кодируемый сенсор пероксида водорода HyPer2 (линия HeLa Kyoto–HyPer2), и с помощью метода окрашивания трипановым синим выявить дозы цисплатина, вызывающие гибель клеток при различных сроках воздействия.

**Материалы и методы.** В работе использованы две клеточные линии: линия карциномы шейки матки человека HeLa Kyoto и та же клеточная линия, трансфицированная генетически-кодируемым цитоплазматическим сенсором HyPer2, который предназначен для динамического исследования уровня внутриклеточного пероксида водорода (HeLa Kyoto–HyPer2) [14]. Клеточные линии были предоставлены Институтом биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (Россия). Анализ цитотоксического действия цисплатина в отношении клеток данных линий проведен с помощью 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 оценить количество жизнеспособных клеток, а в цито-

токсических исследованиях — специфическую гибель клеток, индуцированную тем или иным агентом [15].

Клетки высевали в 96-луночный планшет в количестве 3000 клеток на 1 лунку в 200 мкл среды DMEM (англ. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) («ПанЭко», Россия), содержащей 2 ммоль/л глутамина и 10% FBS (HyClone, США), затем помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 24 ч (37,0°C, 5% CO<sub>2</sub>). Через сутки производили замену исходной среды на среду DMEM с глутамином и 10% FBS, содержащую цисплатин. Концентрации цисплатина варьировали от 0 до 50 мкмоль/л. Еще через сутки производили смену питательной среды на среду с МТТ (0,5 мг/мл), по 200 мкл на лунку. Планшет помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 4 ч, после чего среду с МТТ отбирали, в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора ДМСО и экстрагировали образовавшийся формазан в течение 40 мин при постоянном помешивании. Оптическую плотность полученного раствора формазана в ДМСО измеряли на планшетном спектрофотометре Synergy MX (BioTek, США) при длине волны 570 нм. За 100% жизнеспособность принимали интенсивность окраски в лунках с клетками, не обработанными цисплатином. На графике зависимости количества жизнеспособных клеток от концентрации цисплатина (рис. 1) представлены средние значения по данным шести экспериментов для HeLa Kyoto–HyPer2 и трех экспериментов для HeLa Kyoto, каждый из которых выполнен в трехкратной повторности, и стандартные ошибки среднего. Построение кривых цитотоксичности, определение дозы, вызывающей потерю жизнеспособности 50% клеток (IC<sub>50</sub>), определение 95% доверительного интервала, проведение нелинейной регрессии и сравнение кривых по IC<sub>50</sub> и наклону кривой осуществляли в программе GraphPad Prism 6.01. Уровень статистической значимости различий между значениями IC<sub>50</sub>, полученными при обработке цисплатином исходных и трансфицированных клеток HeLa Kyoto, определяли по критерию Фишера. Статистически значимыми признавались значения  $p < 0,05$ .

С использованием метода окрашивания трипановым синим [16] для линии HeLa Kyoto–HyPer2 вычисляли процентное содержание погибших и живых клеток после инкубации с цисплатином в различных концентрациях. Метод основан на способности красителя проникать внутрь клетки сквозь поврежденные мембраны, живые клетки при этом не окрашиваются.

За сутки до этого эксперимента клетки высаживались на 12-луночный планшет в количестве 150 тыс. клеток на лунку. Культивирование проводилось в среде DMEM с 2 ммоль/л глутамина и 10% FBS. Время экспозиции с препаратом в концентрации, соответствующей IC<sub>50</sub> (8,3 мкмоль/л), составляло от 0 до 24 ч с интервалом 2 ч. Время экспозиции с препаратом в концентрациях 13; 26; 52; 104; 208,3; 416,7; 833,3 мкмоль/л — 2, 4, 6, 8, 24 ч. В контроле к клеткам добавляли среду DMEM

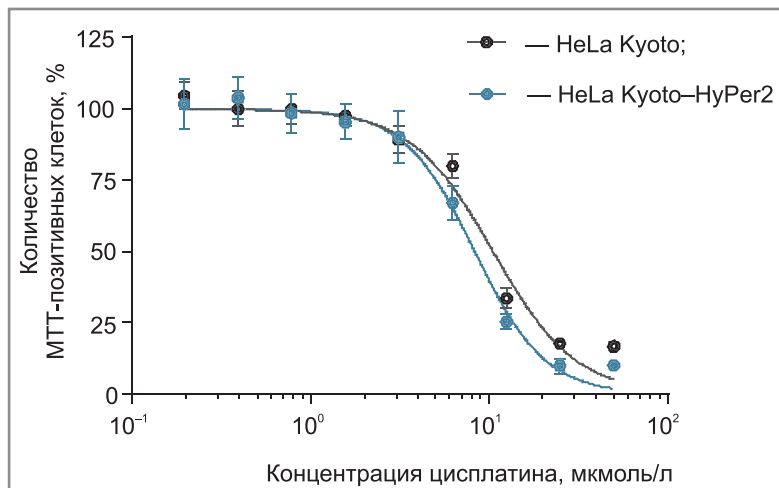
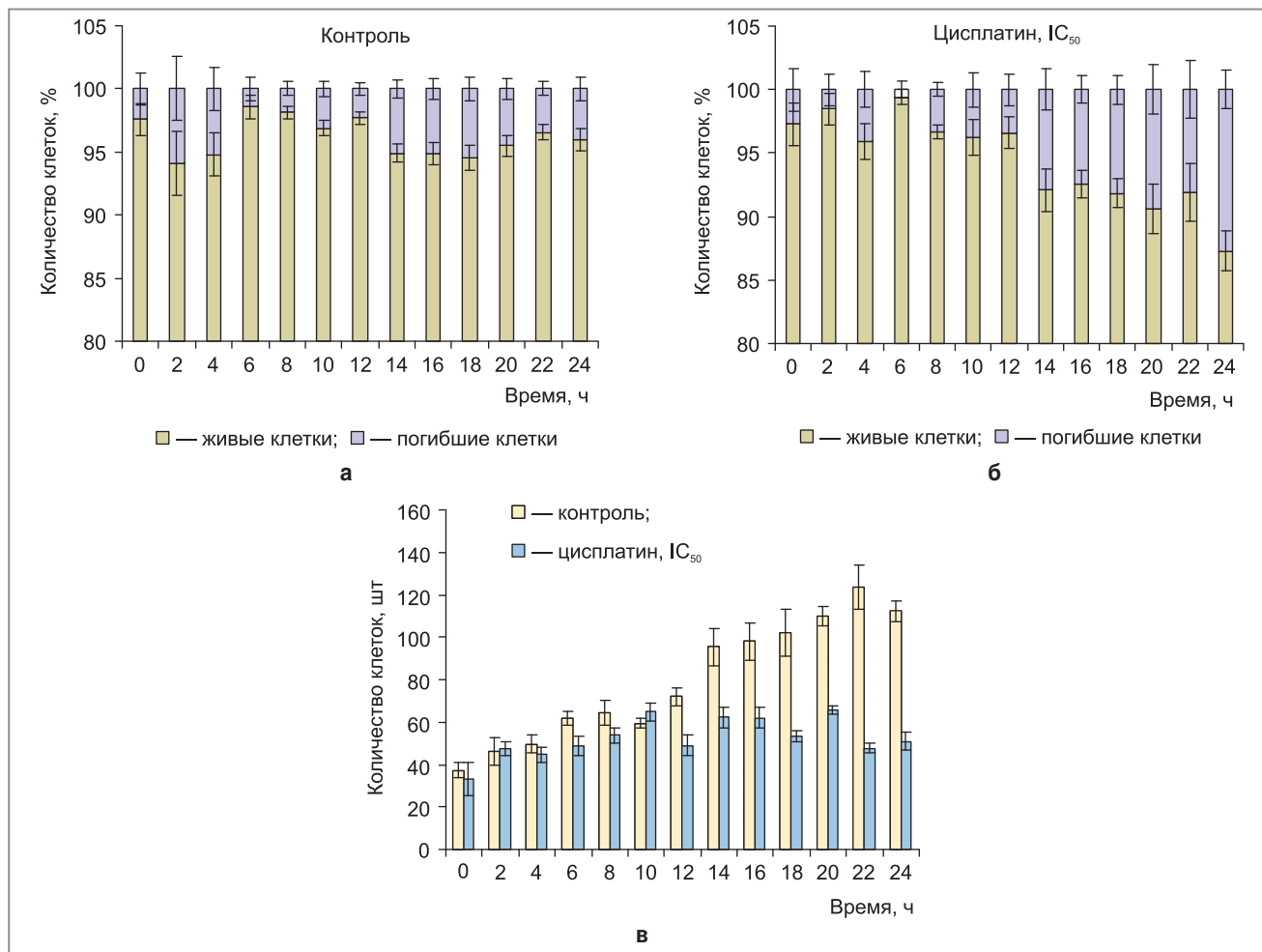


Рис. 1. Ингибирующий эффект различных концентраций цисплатина на линии HeLa Kyoto и HeLa Kyoto–HyPer2 (МТТ-тест)

с 2 ммоль/л глутамина с 10% FBS без цисплатина. Время экспозиции составляло от 0 до 24 ч с интервалом 2 ч. После экспозиции среда из лунок переносилась в микроцентрифужные пробирки. Клетки снимали раствором трипсина–Версена (1:1) в количестве 750 мкл, экспозиция — 5–7 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Затем все содержимое лунки переносилось в соответствующую микроцентрифужную пробирку. Клетки были центрифугированы на вортексе «Фуга/вортекс микроспин FV-2400» (BioSan, Латвия, 2400 об./мин) в течение 5 мин. После удаления надосадочной жидкости к клеткам добавляли раствор PBS (700 мкл). Для окраски использовали 0,4% раствор трипанового синего. Подсчет клеток выполняли в камере Горяева, результаты выражались в процентах живых и погибших клеток от общего их количества. Вычисляли средние арифметические значения, полученные в двукратной повторности в трех лунках, и их стандартные ошибки.

**Результаты.** По данным МТТ-теста построена кривая зависимости жизнеспособности клеток HeLa Kyoto и HeLa Kyoto–HyPer2 от концентрации цисплатина в среде (см. рис. 1). Установлено, что концентрация IC<sub>50</sub>, которая соответствует дозе, вызывающей потерю жизнеспособности 50% клеток (с 95-процентным доверительным интервалом), составляет для HeLa Kyoto–HyPer2 8,3 мкмоль/л [7,307; 9,447], а для HeLa Kyoto — 10,5 мкмоль/л [8,4; 13,9]. Различия между значениями IC<sub>50</sub> для исследованных клеточных линий оказались статистически значимыми ( $p = 0,04$ ).

Проведенное окрашивание трипановым синим (рис. 2, 3) позволило оценить дозо-временную зависимость ответа клеток линии HeLa Kyoto–HyPer2 на воздействие цисплатина. Выявлено, что число погибших клеток при воздействии данного препарата в концентрации IC<sub>50</sub> начинает увеличиваться через 14 ч и продолжает нарастать до 24 ч (до конца эксперимента, рис. 2, б). К 24 ч количество погибших после обработки цисплатином клеток по сравнению с необработанными контрольными клетками повышается в среднем с  $2,7 \pm 1,7$  до  $12,7 \pm 1,5\%$  (рис. 2, а, б). Важно, что общее



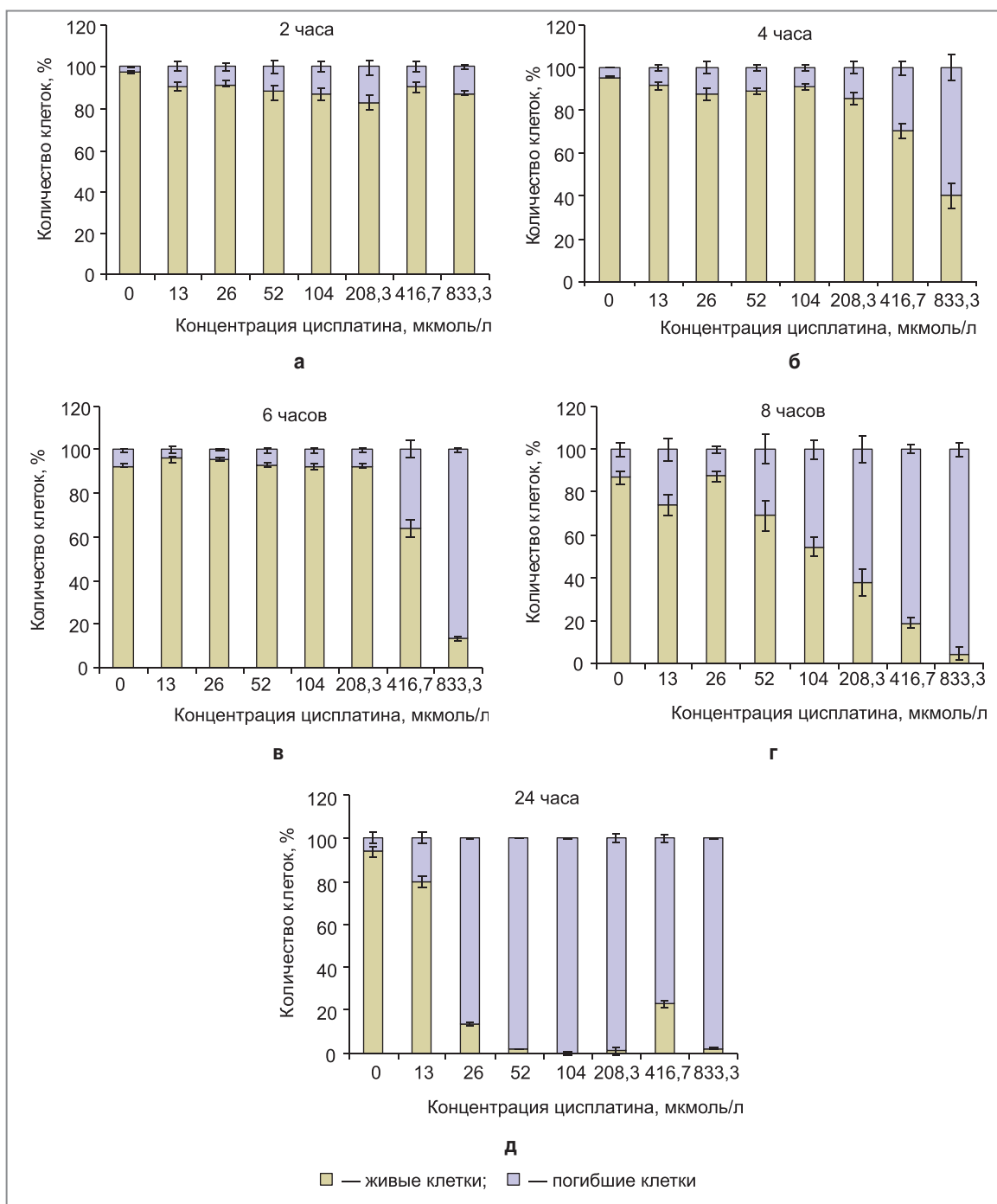
**Рис. 2.** Количество живых и погибших клеток линии HeLa Kyoto-HyPer2 в контроле (а), после воздействия цисплатина в дозе IC<sub>50</sub> (б) и общее количество клеток в контроле и после воздействия цисплатина (в) при различных временах инкубации (окрашивание трипановым синим)

число клеток в присутствии цисплатина не увеличивается, т.е. не происходит их деления, в то время как число контрольных необработанных клеток растет в среднем в 2,3 раза (рис. 2, в). При более высоких дозах препарата отмечено снижение количества живых клеток с  $95,5 \pm 0,2$  до  $40,3 \pm 6,0\%$  уже через 4 ч, а также гибель 80–90% клеток к 6 ч (833,3 мкмоль/л, рис. 3, в).

**Обсуждение.** Изучение цитотоксического действия цисплатина в отношении клеточных линий HeLa Kyoto и HeLa Kyoto-HyPer2 с использованием стандартного МТТ-теста, а также окрашивания трипановым синим позволило определить концентрацию препарата, вызывающую гибель определенного числа клеток.

Согласно данным МТТ-теста, кривые цитотоксичности обеих линий клеток имеют сходную динамику, что говорит о схожей их чувствительности к действию препарата. Поскольку колено кривых относительно короткое и их наклон несколько круче стандартного [17] (наклон кривой для HeLa Kyoto:  $-1,876 [-2,583; -1,170]$ , для HeLa Kyoto-HyPer2:  $-2,196 [-2,739; -1,652]$ ), можно сделать вывод об относительно высокой чувствительности обеих линий к препарату.

Значение IC<sub>50</sub>, полученное в нашей работе, сопоставимо со значениями, представленными в работе [18] для линии HeLa. По данным регрессионного анализа, для трансфицированных клеток HeLa Kyoto значение IC<sub>50</sub> оказалось в 1,3 раза меньше, чем для нетрансфицированных (см. рис. 1). Это свидетельствует о несколько более высокой чувствительности клеток HeLa Kyoto, содержащих сенсор HyPer2, к действию препарата цисплатина, что может быть связано с наличием в клетке флуоресцентного белка. Источники такой повышенной чувствительности трансфицированных клеток могут быть различными. Так, имеются данные об индукции окислительного стресса, вызванного введением в клетку зеленого флуоресцентного белка (GFP), и о соответствующем повышении чувствительности трансфицированных клеточных линий к действию таких химиотерапевтических агентов, как карбоплатин, доксорубин, этопозид и мелфалан, по сравнению с клетками дикого типа [10]. Повышенная чувствительность к противоопухолевым препаратам клеток, трансфицированных белком GFP или его аналогами (желтым флуоресцентным белком или «усиленным» GFP)



**Рис. 3.** Количество живых и погибших клеток линии HeLa Kyoto-HyPer2 после воздействия цисплатина в различных концентрациях при различных временах инкубации: а — 2 ч; б — 4 ч; в — 6 ч; г — 8 ч; д — 24 ч (окрашивание трипановым синим)

тесно связана с продукцией АФК, в частности синглетного кислорода [11]. При этом клетки в ответ на трансфекцию белка GFP и вызываемый им окислительный стресс повышают продукцию глутатиона [10]. Можно предположить, что перечисленные факторы лежат и в основе снижения устойчивости линии HeLa Kyoto-HyPer2 по сравнению с HeLa Kyoto.

Наше исследование продемонстрировало, что выявленное по результатам МТТ-теста 50% снижение жизнеспособности

клеток HeLa Kyoto-HyPer2 при действии цисплатина в концентрации  $IC_{50}$  через 24 ч инкубации определяется не столько гибелью клеток, сколько торможением их деления (см. рис. 2).

С целью определения доз цисплатина, вызывающих клеточную гибель в сроки до 24 ч, был использован ряд возрастающих доз препарата (от 13 мкмоль/л, что превышает  $IC_{50}$  по результатам МТТ-теста в 1,6 раза и приблизительно соответствует дозе, вызывающей



потерю жизнеспособности 80% клеток по результатам МТТ-теста, до сверхвысоких доз). Повышение концентрации препарата вызывало более быструю гибель клеток (см. рис. 3).

В работе [12] показано, что как для нормальных, так и для опухолевых клеток концентрации цисплатина менее 30 мкмоль/л вызывают в большинстве случаев развитие апоптоза, концентрации более 300 мкмоль/л индуцируют гибель по пути некроза, при обработке цисплатином в концентрации 100 мкмоль/л регистрируются оба пути клеточной гибели. Авторы фиксировали характерные признаки развития некроза и апоптоза начиная с 8 ч с момента начала воздействия независимо от концентрации препарата. Методы, использованные в нашем исследовании, не дают возможности сделать точный вывод о путях гибели клеток HeLa Kyoto–HyPer2 после воздействия цисплатина (витальный краситель трипановый синий окрашивает клетки, погибшие как по пути некроза, так и по пути апоптоза [16]), но позволяют определить дозо-временные параметры воздействия.

По результатам окраски клеток трипановым синим выявлено, что мембраны клеток демонстрируют повреждение преимущественно после 8 ч уже при относительно низких концентрациях цисплатина — от 52 мкмоль/л. На этапе 4 и 6 ч клетки окрашивались лишь при экспозиции с цисплатином в концентрациях свыше 416,7 мкмоль/л. Следовательно, вероятные процессы некроза или позднего апоптоза, повреждающие мембраны, запускаются при малой временной экспозиции лишь при высоких концентрациях. Более низкие концентрации препарата также способны привести к некрозу и позднему апоптозу при условии длительного воздействия. По-видимому, при небольших концентрациях, сопоставимых с  $IC_{50}$ , происходит ингибирование деления клеток, не приводящее к их гибели в течение 24 ч. При более высоких концентрациях — до 52 мкмоль/л — если и происходит гибель клеток, то она связана с процессами раннего апоптоза в течение первых 8 ч экспозиции (такие клетки не окрашиваются трипановым синим), после этого времени можно наблюдать поздний апоптоз и некроз. Высокие концентрации препарата способны приводить к гибели клеток уже при небольших экспозициях.

Полученные результаты представляются весьма важными в нескольких отношениях. Во-первых, различия в чувствительности клеточных линий и дозозависимые эффекты воздействия, выявленные в ходе исследования, необходимо учитывать при расчете оптимальных рабочих концентраций препарата. Во-вторых, результаты исследования необходимы для понимания закономерностей токсического действия препарата в отношении линии HeLa Kyoto–HyPer2, несущей генетически-кодированный сенсор, и дальнейшего ее использования при анализе роли пероксида водорода в механизме клеточной гибели, индуцированной цисплатином.

**Заключение.** Сравнительное исследование эффектов цисплатина в отношении клеточных линий HeLa Kyoto и HeLa Kyoto–HyPer2 выявило, что трансфекция клеток флюоресцентным белком вызывает статисти-

чески значимое повышение чувствительности к препарату. Концентрация цисплатина, соответствующая  $IC_{50}$ , при воздействии в течение 24 ч не приводит к гибели клеток HeLa Kyoto–HyPer2, а вызывает торможение их деления. При концентрациях цисплатина менее 52 мкмоль/л повреждение мембран не проявляется в течение 8 ч, а в случае использования высоких концентраций — 416,7 мкмоль/л — повреждение возможно уже после 4 ч экспозиции. Вероятно, временной промежуток от 0 до 8 ч после добавления цисплатина в дозе менее 52 мкмоль/л является оптимальным для изучения процессов раннего апоптоза у данной линии опухолевых клеток. Полученные данные следует учитывать при изучении молекулярных механизмов развития повреждения нормальных и опухолевых клеток под воздействием цисплатина с использованием генетически-кодированных сенсоров.

**Финансирование исследования.** Гранты РФФИ (№13-04-97165, №13-04-40228-Н), гранты Министерства образования и науки Российской Федерации (№11.G 34. 31.0017, №14.Z50.31.0022).

**Конфликт интересов.** У авторов нет конфликта интересов.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность д.б.н. Лукьянову С.А. и д.б.н. Белоусову В.В. за предоставленные линии клеток, к.б.н. Балалаевой И.В., к.б.н. Здобновой Т.А. и Соколовой Е.А. за помощь при подготовке и проведении экспериментов, а также при анализе данных.

## Литература

- Johnson N.P., Butour J.-L., Villani G., Wimmer F.L., Defais M., Pierson V., Brabec V. Metal anti-tumor compounds: the mechanism of action of platinum complexes. *Prog Clin Biochem Med* 1989; 10: 1–24.
- Itoh T., Terazawa R., Kojima K., Nakane K., Deguchi T., Ando M., Tsukamasa Y., Ito M., Nozawa Y. Cisplatin induces production of reactive oxygen species via NADPH oxidase activation in human prostate cancer cells. *Free Radic Res* 2011; 45(9): 1033–1039, <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2011.591391>.
- 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, <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.33.1867>.
- Wang W., Fang H., Groom L., Cheng A., Zhang W., Liu J., Wang X., Li K., Han P., Zheng M., Yin J., Wang W., Mattson M.P., Kao J.P., Lakatta E.G., Sheu S.S., Ouyang K., Chen J., Dirksen R.T., Cheng H. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 2008; 134(2): 279–290, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.017>.
- Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Staroverov D.B., Shakhbazov K.S., Terskikh A.V., Lukyanov S. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 2006; 3(4): 281–286.
- Markvicheva K.N., Bogdanova E.A., Staroverov D.B., Lukyanov S., Belousov V.V. Imaging of intracellular hydrogen peroxide production with HyPer upon stimulation of HeLa cells with epidermal growth factor. *Methods Mol Biol* 2009; 476: 76–83.
- Pearce L.L., Gandley R.E., Han W., Wasserloos K., Stitt M., Kanai A.J., McLaughlin M.K., Pitt B.R., Levitan E.S. Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green

fluorescent fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(1): 477–482, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.1.477>.

8. Белова А.С., Мишина Н.М., Орлова А.Г., Сергеева Е.А., Масленникова А.В., Брилкина А.А., Шахова Н.М., Белоусов В.В., Лукьянов С.А. Исследование влияния цисплатина на уровень пероксида водорода и pH в клетках линии HeLa с использованием генетически кодируемых сенсоров. *Современные технологии в медицине* 2013; 5(4): 19–24.

9. Belova A.S., Orlova A.G., Maslennikova A.V., Brilkina A.A., Balalaeva I.V., Antonova N.O., Mishina N.M., Shakhova N.M., Belousov V.V. The study of hydrogen peroxide level under cisplatin action using genetically encoded sensor HyPer. *Proceedings of SPIE* 2014; 8956: 895612, <http://dx.doi.org/10.1117/12.2037737>.

10. Goto H., Yang B., Petersen D., Pepper K.A., Alfaro P.A., Kohn D.B., Reynolds C.P. Transduction of green fluorescent protein increased oxidative stress and enhanced sensitivity to cytotoxic drugs in neuroblastoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(9): 911–917.

11. Greenbaum L., Rothmann C., Lavie R., Malik Z. Green fluorescent protein photobleaching: a model for protein damage by endogenous and exogenous singlet oxygen. *Biol Chem* 2000; 381: 1251–1258, <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2000.153>.

12. Sancho-Martínez S.M., Piedrafita F.J., Cannata-Andía J.B., López-Novoa J.M., López-Hernández F.J. Necrotic concentrations of cisplatin activate the apoptotic machinery but inhibit effector caspases and interfere with the execution of apoptosis. *Toxicol Sci* 2011; 122(1): 73–85, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfr098>.

13. Schwerdt G., Freudinger R., Schuster C., Weber F., Thews O., Gekle M. Cisplatin-induced apoptosis is enhanced by hypoxia and by inhibition of mitochondria in renal collecting duct cells. *Toxicol Sci* 2005; 85(1): 735–742, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfi117>.

14. Markvicheva K.N., Bilan D.S., Mishina N.M., Gorokhovatsky A.Yu., Vinokurov L.M., Lukyanov S., Belousov V.V. A genetically encoded sensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with expanded dynamic range. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2011; 19(3): 1079–1084, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.07.014>.

15. 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, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

16. Louis K.S., Siegel A.C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol* 2011; 740: 7–12, [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_2).

17. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. М: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2010; 691 с.

18. Комлева Н.В., Костюк Г.В., Пархоменко И.И., Балалаева И.В., Голубев В.А., Сень В.Д., Терентьев А.А. Сравнительный анализ цитотоксичности и влияния на клеточный цикл аминонитроксильных комплексов платины (IV). *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского* 2011; 2(2): 82–89.

## References

1. Johnson N.P., Butour J.-L., Villani G., Wimmer F.L., Defais M., Pierson V., Brabec V. Metal anti-tumor compounds: the mechanism of action of platinum complexes. *Prog Clin Biochem Med* 1989; 10: 1–24.

2. Itoh T., Terazawa R., Kojima K., Nakane K., Deguchi T., Ando M., Tsukamasa Y., Ito M., Nozawa Y. Cisplatin induces production of reactive oxygen species via NADPH oxidase activation in human prostate cancer cells. *Free Radic Res* 2011; 45(9): 1033–1039, <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2011.591391>.

3. 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, <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.33.1867>.

4. Wang W., Fang H., Groom L., Cheng A., Zhang W., Liu J., Wang X., Li K., Han P., Zheng M., Yin J., Wang W., Mattson M.P., Kao J.P., Lakatta E.G., Sheu S.S., Ouyang K., Chen J., Dirksen R.T., Cheng H. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 2008; 134(2): 279–290, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.017>.

5. 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.

6. Markvicheva K.N., Bogdanova E.A., Staroverov D.B., Lukyanov S., Belousov V.V. Imaging of intracellular hydrogen peroxide production with HyPer upon stimulation of HeLa cells with epidermal growth factor. *Methods Mol Biol* 2009; 476: 76–83.

7. Pearce L.L., Gandley R.E., Han W., Wasserloos K., Stitt M., Kanai A.J., McLaughlin M.K., Pitt B.R., Levitan E.S. Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green fluorescent fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(1): 477–482, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.1.477>.

8. Belova A.S., Mishina N.M., Orlova A.G., Sergeeva E.A., Maslennikova A.V., Brilkina A.A., Shakhova N.M., Belousov V.V., Lukyanov S.A. The study of cisplatin effect on hydrogen peroxide and PH level in HeLa Kyoto cell line using genetically-encoded sensors. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2013; 5(4): 19–24.

9. Belova A.S., Orlova A.G., Maslennikova A.V., Brilkina A.A., Balalaeva I.V., Antonova N.O., Mishina N.M., Shakhova N.M., Belousov V.V. The study of hydrogen peroxide level under cisplatin action using genetically encoded sensor HyPer. *Proceedings of SPIE* 2014; 8956: 895612, <http://dx.doi.org/10.1117/12.2037737>.

10. Goto H., Yang B., Petersen D., Pepper K.A., Alfaro P.A., Kohn D.B., Reynolds C.P. Transduction of green fluorescent protein increased oxidative stress and enhanced sensitivity to cytotoxic drugs in neuroblastoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(9): 911–917.

11. Greenbaum L., Rothmann C., Lavie R., Malik Z. Green fluorescent protein photobleaching: a model for protein damage by endogenous and exogenous singlet oxygen. *Biol Chem* 2000; 381: 1251–1258, <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2000.153>.

12. Sancho-Martínez S.M., Piedrafita F.J., Cannata-Andía J.B., López-Novoa J.M., López-Hernández F.J. Necrotic concentrations of cisplatin activate the apoptotic machinery but inhibit effector caspases and interfere with the execution of apoptosis. *Toxicol Sci* 2011; 122(1): 73–85, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfr098>.

13. Schwerdt G., Freudinger R., Schuster C., Weber F., Thews O., Gekle M. Cisplatin-induced apoptosis is enhanced by hypoxia and by inhibition of mitochondria in renal collecting duct cells. *Toxicol Sci* 2005; 85(1): 735–742, <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfi117>.

14. Markvicheva K.N., Bilan D.S., Mishina N.M., Gorokhovatsky A.Yu., Vinokurov L.M., Lukyanov S., Belousov V.V. A genetically encoded sensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with expanded dynamic range. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2011; 19(3): 1079–1084, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.07.014>.

15. 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, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

16. Louis K.S., Siegel A.C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol* 2011; 740: 7–12, [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_2).

17. Фрешни Р.Я. *Культура животных клеток* [Animal cell culture]. Moscow: BINOM. Laboratoriya znaniy; 2010; 691 p.

18. Komleva N.V., Kostyuk G.V., Parkhomenko I.I., Balalaeva I.V., Golubev V.A., Sen V.D., Terentev A.A. Comparative analysis of cytotoxicity and the effect of platinum (IV) complexes with aminonitroxyl radicals on the cell cycle. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo* 2011; 2(2): 82–89.