

# ПРОТЕКТОРНАЯ РОЛЬ N,N'-ДИМЕТИЛТИОМОЧЕВИНЫ И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЦИСПЛАТИНА НА КЛЕТКИ HELA KYOTO

DOI: 10.17691/stm2018.10.3.9

УДК 615.277.3:576

Поступила 22.02.2018 г.

А.С. Неруш, младший научный сотрудник лаборатории биофотоники<sup>1</sup>;К.М. Щукина, студент кафедры биофизики<sup>2</sup>;А.Г. Орлова, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биофотоники<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики Российской академии наук, Н. Новгород, 603950, ул. Ульянова, 46;

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23

**Цель исследования** — оценка содержания пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в жизнеспособных и апоптотических клетках HeLa Kyoto при воздействии цисплатина в условиях применения ловушки активных форм кислорода — N,N'-диметилтиомочевина (ДМТМ).

**Материалы и методы.** Клетки линии HeLa Kyoto, трансфицированные сенсором пероксида водорода HyPer2 или сенсором pH SypHer2, подвергали инкубации с цисплатином в течение 24 ч в присутствии или в отсутствие ДМТМ. Жизнеспособность клеток определяли методом окрашивания трипановым синим и проточной цитофлуориметрии с маркером апоптоза и витальным красителем. Отклик сенсоров определяли отдельно в жизнеспособных клетках и в клетках в стадии раннего апоптоза.

**Результаты.** Установлено снижение процента жизнеспособных клеток при воздействии цисплатина, которое ингибируется добавлением ДМТМ в инкубационную среду. Выявлено значительное увеличение содержания пероксида водорода в исследуемой культуре при воздействии цисплатина, в то время как при одновременной инкубации с цисплатином и ДМТМ значение было близко к контрольному. Наблюдаемая реакция характерна как для жизнеспособных, так и для апоптотических клеток.

**Заключение.** Доказаны протекторная роль ДМТМ и участие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в гибели опухолевых клеток при воздействии цисплатина.

**Ключевые слова:** HeLa Kyoto; флуоресцентный сенсор; HyPer2; SypHer2; цисплатин; пероксид водорода; N,N'-диметилтиомочевина.

**Как цитировать:** Nerush A.S., Shchukina K.M., Orlova A.G. The protective role of N,N'-dimethylthiourea and its effect on hydrogen peroxide level of hela kyoto cells under cisplatin action. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(3): 78–87, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.3.9>

## English

### The Protective Role of N,N'-Dimethylthiourea and Its Effect on Hydrogen Peroxide Level of Hela Kyoto Cells under Cisplatin Action

A.S. Nerush, Junior Researcher, Laboratory of Biophotonics<sup>1</sup>;K.M. Shchukina, Student, Department of Biophysics<sup>2</sup>;A.G. Orlova, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Biophotonics<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Center Institute of Applied Physics of the Russian Academy of Sciences, 46 Ul'yanova St., Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

<sup>2</sup>Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

**The aim of the study** is to sense the level of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in viable and apoptotic HeLa Kyoto cells under the action of cisplatin in presence of reactive oxygen species scavenger N,N'-dimethylthiourea (DMTU).

**Materials and Methods.** HeLa Kyoto cell line transfected with hydrogen peroxide sensor HyPer2 or pH sensor SypHer2 was

**Для контактов:** Неруш Анастасия Сергеевна, e-mail: nerush-as@mail.ru

incubated with cisplatin for 24 h with or without DMTU. The viability of the cells was determined by trypan blue staining technique and flow cytometry with apoptosis marker and vital dye. The response of the sensors was determined in viable cells and in cells in early apoptosis separately.

**Results.** A decrease in the percentage of viable cells upon exposure to cisplatin inhibited by the addition of DMTU to the incubation medium was shown. A significant increase in  $H_2O_2$  level in HeLa Kyoto cells was observed upon drug exposure, while incubation with cisplatin and DMTU simultaneously resulted in a value close to the control one. The observed reaction was typical for both viable and apoptotic cells.

**Conclusion.** The protective role of DMTU and the involvement of  $H_2O_2$  in tumor cells death under the cisplatin action was proved.

**Key words:** HeLa Kyoto; fluorescent sensor; HyPer2; SypHer2; cisplatin; hydrogen peroxide; N,N'-dimethylthiourea.

## Введение

Цисплатин — платиносодержащий химиотерапевтический препарат, успешно применяемый в лечении широкого ряда опухолей, таких как карциномы, лимфомы, саркомы, герминогенные опухоли и др. [1, 2].

Наряду с прямым действием на ДНК данный препарат вызывает образование активных форм кислорода (АФК), в том числе и пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) [3, 4]. Среди АФК пероксид водорода представляет особый интерес в связи с данными об его участии в апоптозе опухолевых клеток.  $H_2O_2$  опосредует апоптоз путем ингибирования экспрессии белка Bcl-2 [5], а также активации каспаз и экспрессии белка Вах [6–8]. Поэтому исследование возможной роли пероксида водорода в цисплатин-индуцированном апоптозе опухолевых клеток с целью разработки более безопасных и эффективных противоопухолевых препаратов является в настоящее время перспективной задачей.

Исследование изменений внутриклеточного уровня  $H_2O_2$  сопряжено с рядом сложностей его измерения. В последнее время разработаны специфические флуоресцентные зонды, чувствительность которых к пероксиду водорода основана на его способности флуоресцировать при окислении. Однако эти зонды обладают рядом ограничений, связанных с низкой селективностью или необратимостью реакции с  $H_2O_2$  [9]. Данные недостатки отсутствуют у генетически-кодируемого сенсора HyPer. Этот сенсор на основе пероксидчувствительного домена Оху-R и желтого флуоресцентного белка обладает высокой селективностью и чувствительностью, прямой экспрессией в клетках и может быть направлен в различные субклеточные компартменты [10]. К настоящему времени с использованием данного сенсора был исследован уровень пероксида водорода в трансфицированных опухолевых клетках при действии химиотерапии [11], фотодинамической терапии [12], ростовых факторов [13], а также в макрофагах при фагоцитозе [14]. В этих работах для оценки реакции сенсора была использована флуоресцентная микроскопия. Ранее нами был предложен новый подход к изучению уровня пероксида водорода в клетках, экспрессирующих HyPer, — на основе проточной

цитофлюориметрии [15]. Такой подход позволяет оценить уровень  $H_2O_2$  отдельно в жизнеспособных клетках и в клетках, проходящих стадию раннего апоптоза. Подход был апробирован при изучении механизмов клеточной гибели и отклика сенсора при воздействии цисплатина и блеомицина на опухолевые клетки.

Для подтверждения связи активации сенсора с цисплатин-индуцированной клеточной гибелью необходимо искусственно снизить уровень  $H_2O_2$  внутри клетки, что должно привести к отсутствию отклика сенсора и повышению процента жизнеспособных клеток при добавлении цисплатина. Для решения этой задачи в настоящей работе была использована ловушка АФК N,N'-диметилтиомочевина (ДМТМ). ДМТМ является высокоэффективным поглотителем  $OH^\bullet$ ,  $^1O_2$  [16, 17] и  $H_2O_2$  [18] и снижает индуцированное  $H_2O_2$  повреждение культивированных эндотелиальных клеток [19], индуцированную цисплатином экспрессию фактора некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) в макрофагах *in vitro*, а также предотвращает развитие окислительного стресса, активацию p53 и, как следствие, апоптоза почечных и печеночных клеток *in vivo* [20–23]. Важным шагом является проведение экспериментов по исследованию цитотоксичности цисплатина в условиях искусственного удаления  $H_2O_2$  из клеток с использованием ДМТМ. Для подтверждения того, что при действии цисплатина ловушка вызывает снижение содержания  $H_2O_2$  (в ряду других АФК), в нашей работе параллельно с цитотоксическими тестами его количество контролировалось при помощи специфического сенсора HyPer2. Такой подход обеспечивает возможность определения роли пероксида водорода в процессе цисплатин-индуцированной клеточной гибели.

**Цель исследования** — оценка содержания пероксида водорода в жизнеспособных и апоптотических клетках HeLa Kyoto при воздействии цисплатина в условиях применения ловушки активных форм кислорода — N,N'-диметилтиомочевины.

## Материалы и методы

**Клеточные линии.** В работе использовались клетки линии HeLa Kyoto — цервикальной карциномы че-

ловека, трансфицированные цитоплазматическим сенсором HyPer2 (модификация HyPer с расширенным диапазоном чувствительности) — HeLa Kyoto-HyPer2. Сенсор обладает высокой чувствительностью к изменению уровня пероксида водорода в клетках [13], но, как и большинство флуоресцентных белков, является pH-чувствительным. Это обусловило необходимость контроля внутриклеточного pH, для чего параллельно была использована линия HeLa Kyoto, трансфицированная сенсором SypHer2 [24] — нечувствительным к пероксиду водорода аналогом HyPer2. Клеточные линии были получены из Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Россия).

Клетки культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко — ДМЕМ («ПанЭко», Россия) с добавлением 2 мМ глутамина и 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>.

**Окрашивание трипановым синим.** Клетки высаживали на 12-луночные планшеты в количестве  $1 \cdot 10^5$  клеток на лунку за сутки до эксперимента, затем подвергали воздействию цисплатина в концентрации 16,6 мкМ, соответствовавшей двукратному значению IC<sub>50</sub> (концентрации, вызывающей ингибирование 50% клеток) [25], в присутствии или в отсутствие ДМТМ (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 15 мМ. Инкубацию проводили в течение 24 ч, после чего среду с клетками отбирали в центрифужные пробирки, с подложки клетки смывали холодным раствором натрий-фосфатного буфера (PBS) дважды и центрифугировали в течение 5 мин на центрифуге Refrigerated Centrifuge 5810 (Eppendorf, Германия) при 900 об./мин. После центрифугирования клетки заливали раствором PBS и добавляли 0,4% раствор трипанового синего в соотношении 1:1. Для подсчета окрашенных и неокрашенных клеток использовали камеру Горяева.

**Проточная цитофлуориметрия с маркерами апоптоза.** Клетки высаживали на 12-луночные планшеты в количестве  $1 \cdot 10^5$  клеток на лунку за сутки до эксперимента, затем подвергали воздействию 16,6 мкМ цисплатина в присутствии или в отсутствие 15 мМ ДМТМ. Контролем служили клетки без воздействия цисплатина и/или ДМТМ. После 24 ч инкубации с препаратом среду с клетками отбирали в центрифужные пробирки, с подложки клетки смывали холодным раствором PBS дважды. Клетки, осажденные центрифугированием, в течение 5 мин на центрифуге Refrigerated Centrifuge 5810 (Eppendorf, Германия) при 900 об./мин заливали аннексинсвязывающим буфером в количестве  $1,5 \cdot 10^6$  кл./мл;  $1,5 \cdot 10^5$  клеток было перемещено в пробирки для проточной цитофлуориметрии.

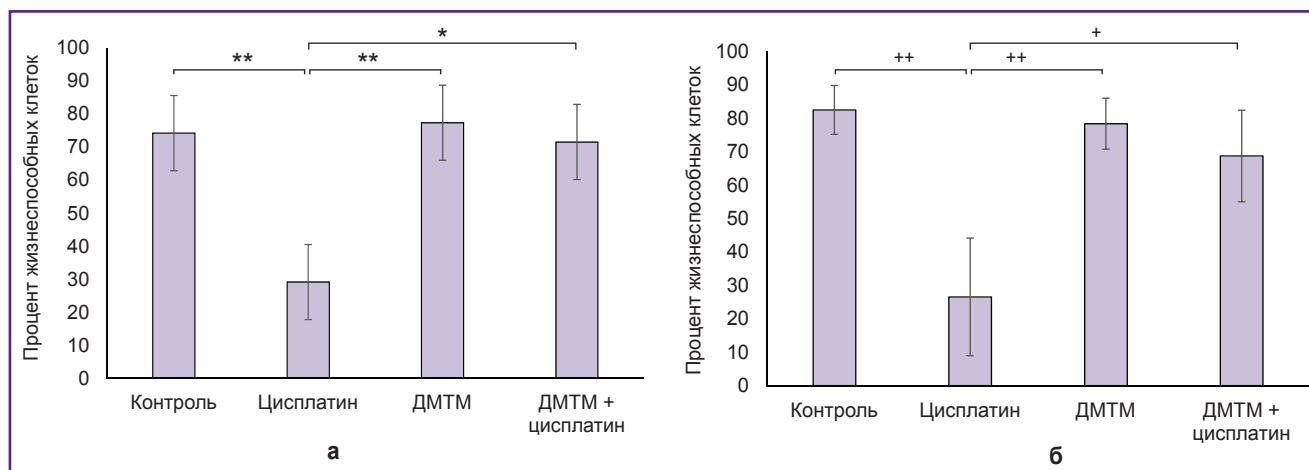
Для анализа флуоресценции сенсоров в жизнеспособных клетках и клетках в стадии раннего апоптоза был использован подход, предложенный нами ранее [15]. Данный подход позволяет одновременную оценку путей клеточной гибели и содержания

пероксида водорода в каждой клетке с использованием маркера на апоптоз Аннексина V, меченного фикоэритрином — ФЭ (ФЭ-Аннексин V), витального красителя 7-амино-актиномицина D (7-AAD) и сенсора на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Для анализа путей клеточной гибели был использован набор PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, США). К каждой пробе было добавлено по 5 мкл ФЭ-Аннексина V и 7-AAD, после чего пробы перемешивали 1–2 с на центрифуге-вортекс Microspin FV-2400 (BioSan, Латвия) и инкубировали в темноте при температуре 25°C в течение 15 мин. По истечении данного времени пробы перемещали на холод, перед регистрацией флуоресценции к клеткам добавляли по 400 мкл аннексинсвязывающего буфера. Изменение интенсивностей флуоресценции красителей и отклик генетически кодируемых сенсоров регистрировали при помощи проточного цитофлуориметра FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с возбуждающим лазером 488 нм и тремя каналами регистрации с использованием фильтров 530/30 нм (флуоресценция HyPer2 и SypHer2, канал FL1), 585/42 нм (флуоресценция ФЭ-Аннексина V, канал FL2), 670 LP (флуоресценция 7-AAD, канал FL3). В каждой пробе анализу подвергали по  $1,5 \cdot 10^4$  клеток.

**Обработка данных.** При оценке жизнеспособности клеток методом окрашивания трипановым синим было проведено 5 экспериментов на клеточной линии HeLa Kyoto-HyPer2 и 3 эксперимента на клеточной линии HeLa Kyoto-SypHer2. Данные были обработаны при помощи программного обеспечения Excel 2016 (Microsoft, США) и представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. Для определения статистической значимости различий между группами использовали однофакторный дисперсионный post-hoc анализ с критерием Бонферрони для множественных сравнений в программе Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для расчета процента жизнеспособных клеток, клеток в стадии раннего апоптоза и мертвых клеток, а также медианных значений интенсивностей флуоресценции сенсоров была использована программа BD CellQuest™ Pro Software (Becton Dickinson, США).

## Результаты

Результаты окрашивания клеток HeLa Kyoto-HyPer2 трипановым синим показали статистически значимое снижение процента жизнеспособных клеток при воздействии цисплатина с  $74,2 \pm 9,2$  до  $29,1 \pm 15,6\%$  ( $p < 0,0001$ ) по сравнению с контролем (с необработанными цисплатином клетками) (рис. 1, а). Этот эффект не наблюдался и при добавлении в инкубационную среду ДМТМ одновременно с цисплатином, что приводило к статистически значимому ( $p < 0,001$ ) увеличению количества живых клеток до  $71,5 \pm 13,2\%$  по сравнению с клетками, обработанными только цисплатином. При этом следует



**Рис. 1. Процент жизнеспособных клеток HeLa Kyoto-HyPer2 (а) и HeLa Kyoto-SypHer2 (б):** воздействие цисплатином в концентрации 16,6 мкМ и/или ДМТМ в концентрации 15 мМ в течение 24 ч (результаты окрашивания трипановым синим); \* —  $p < 0,001$ ; \*\* —  $p < 0,0001$ ; + —  $p < 0,05$ ; ++ —  $p < 0,01$

отметить, что добавление ДМТМ к необработанным цисплатином клеткам не оказывало негативного воздействия на жизнеспособность данной клеточной линии —  $77,7 \pm 8,1\%$ .

Окрашивание клеток HeLa Kyoto-SypHer2 трипановым синим (рис. 1, б) показало схожие результаты: при добавлении цисплатина выявлялось статистически значимое снижение процента жизнеспособных клеток с  $82,5 \pm 7,3$  до  $26,5 \pm 17,6\%$  ( $p < 0,01$ ) по сравнению с необработанными цисплатином клетками. В случае добавления ДМТМ к обработанным препаратом клеткам наблюдалось статистически значимое увеличение процента жизнеспособных клеток до  $68,7 \pm 13,7\%$  ( $p < 0,05$ ) по сравнению с обработанными только цисплатином, что говорит о нивелировании ДМТМ эффекта цисплатина.

Проведенная в дальнейшем проточная цитофлуориметрия с окрашиванием клеток маркером апоптоза и витальным красителем позволила выделить три популяции клеток: жизнеспособные клетки — отрицательные по 7-AAD и ФЭ-Аннексину V; клетки в стадии раннего апоптоза — положительные по ФЭ-Аннексину V и отрицательные по 7-AAD; а также клетки в позднем апоптозе или некрозе (мертвые клетки) — как положительные по обоим красителям, так и положительные по 7-AAD и отрицательные по ФЭ-Аннексину V (рис. 2, 3).

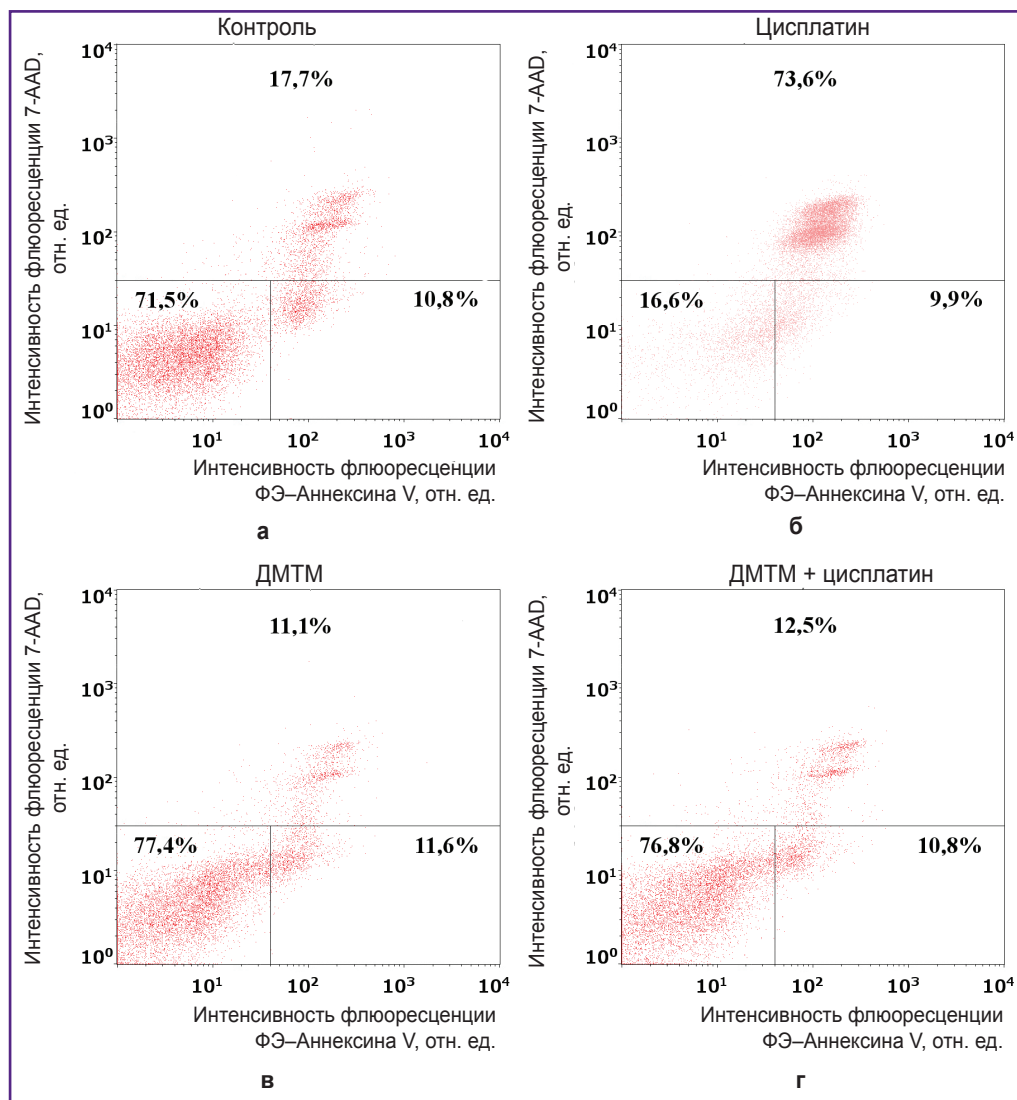
Проточная цитофлуориметрия показала, что добавление цисплатина к клеткам линии HeLa Kyoto-HyPer2 приводит к значительному увеличению числа мертвых клеток — с 17,7 до 73,6% (рис. 2, а, б), при этом не вызывает увеличения количества клеток, проходящих стадию раннего апоптоза: 10,8% — в контроле и 9,9% — при обработке только цисплатином. Количество жизнеспособных клеток при добавлении цисплатина уменьшается более чем на 50%: с 71,5 до 16,6%. Одновременная инкубация клеток с цисплатином и ДМТМ приводит к увеличению процента жизнеспособных клеток с 16,6 до 76,8% (рис. 2, б, в), при этом в раннем апоптозе он изменяется незначительно и равен таковому в контроле. Обработка ДМТМ клеток, не подвергшихся воздействию препарата, не оказывает отрицательного влияния на жизнеспособность данной клеточной линии.

Окрашивание 7-AAD и ФЭ-Аннексин V контрольной культуры HeLa Kyoto-SypHer2 показало схожие результаты (см. рис. 3): добавление ДМТМ к обработанным цисплатином клеткам вызывало увеличение процента жизнеспособных клеток с 11,9 до 61,8% и уменьшение процента клеток, проходящих стадию раннего апоптоза, с 24,4 до 8,1%. Обработка ДМТМ клеток, не подвергшихся воздействию препарата, также не оказывала отрицательного влияния на жизнеспособность клеточной линии.

Использование маркера апоптоза и витального красителя позволило построить гистограммы флуоресценции сенсоров HyPer2 и SypHer2 для всей популяции клеток (рис. 4, а, б), а также отдельно для живых клеток (рис. 4, в, е) и клеток в стадии раннего апоптоза (рис. 4, д, е).

На гистограмме флуоресценции HeLa Kyoto-HyPer2 (см. рис. 4, а), построенной для всех клеток, можно отметить увеличение интенсивности флуоресценции обработанных цисплатином клеток по сравнению с контролем, которое снижается при добавлении ДМТМ. На подобных гистограммах, построенных для клеточной линии, содержащей SypHer2 (см. рис. 4, б), отмечается снижение интенсивности флуоресценции обработанных цисплатином клеток в сравнении с контрольными, необработанными клетками, при этом она возвращается к значениям флуоресценции контрольных клеток в ответ на добавление ДМТМ. Часть популяции клеток, отличающихся низкой интенсивностью флуо-





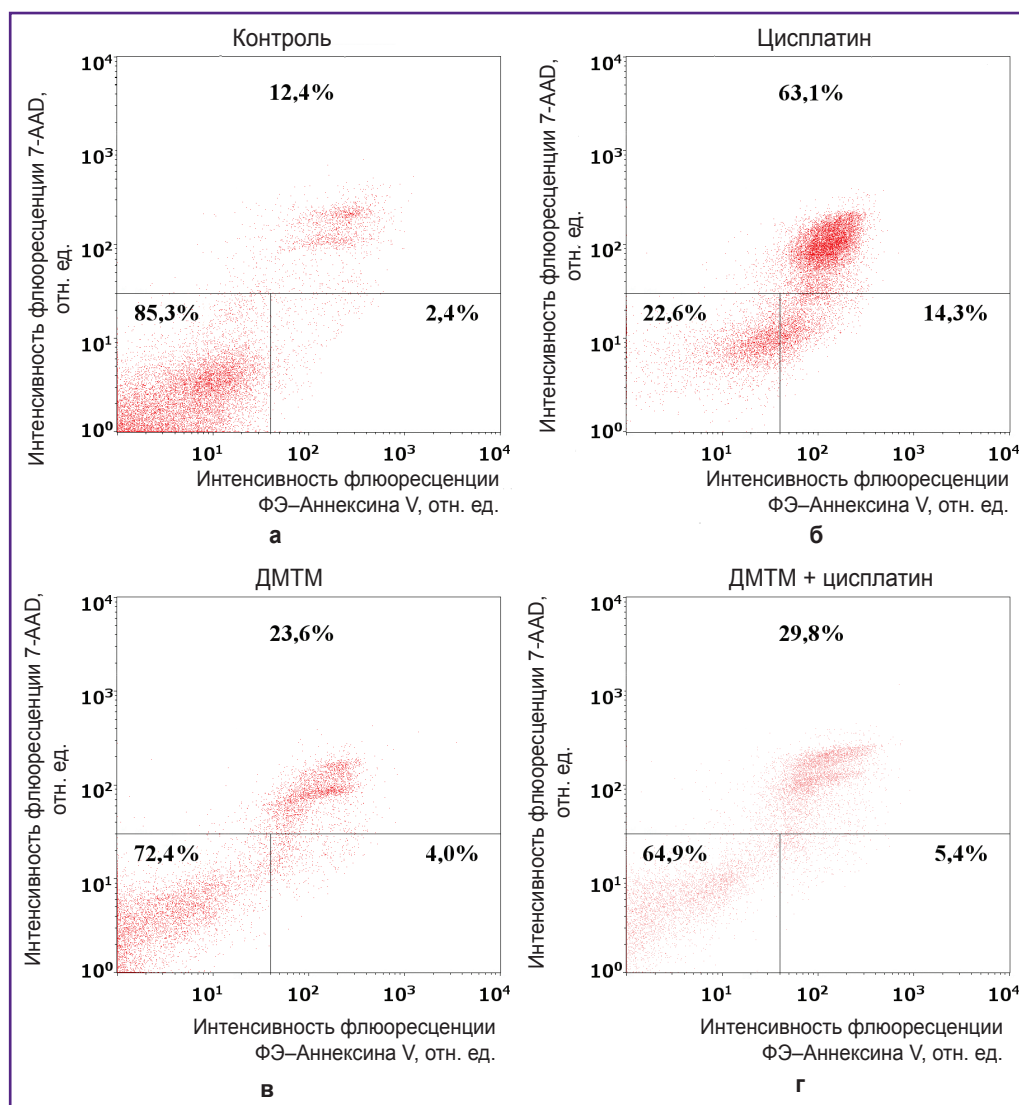
**Рис. 2. Распределение клеток HeLa Kyoto-HyPer2 по интенсивности флюоресценции 7-AAD и ФЭ-Аннексина V:**

*а* — без воздействия; *б* — после воздействия 16,6 мкМ цисплатина; *в* — после воздействия 15 мМ ДМТМ; *г* — после воздействия 16,6 мкМ цисплатина и ДМТМ в концентрации 15 мМ; Инкубация в течение 24 ч; жизнеспособные клетки располагаются в левом нижнем квадранте; клетки, претерпевающие ранний апоптоз, — в правом нижнем квадранте; мертвые клетки — в левом и правом верхних квадрантах

ресценции сенсоров (примерно до 100 отн. ед., см. рис. 4, *а*, *б*), представляла собой погибшие клетки, хорошо окрашивающиеся 7-AAD, и не использовалась для анализа (данные не показаны). На гистограммах, построенных для живых клеток и клеток в стадии раннего апоптоза, была выделена область для оценки медианного значения интенсивности флюоресценции сенсоров (M1). Это позволило оценить разницу во флюоресценции разных проб клеток.

У жизнеспособных клеток HeLa Kyoto-HyPer2 (см. рис. 4, *в*, *г*) добавление ДМТМ приводило к незначительному снижению медианного значения

интенсивностей флюоресценции сенсора с 221 до 215 отн. ед., в то время как у жизнеспособных клеток, содержащих SypHer2, это вызывало незначительный рост медианного значения интенсивности с 389 до 414 отн. ед. Добавление цисплатина к клеткам, содержащим HyPer2, приводило к двукратному увеличению медианного значения интенсивности флюоресценции — до 461 отн. ед., в то время как у линии клеток, несущих SypHer2, инкубация с цисплатином вызывала снижение медианного значения интенсивности до 300 отн. ед. Добавление ДМТМ одновременно с цисплатином вызывало уменьшение медианного значения интенсивности флюоресценции



**Рис. 3. Распределение клеток HeLa Kyoto-SypHer2 по интенсивности флуоресценции 7-AAD и ФЭ-Аннексина V:**

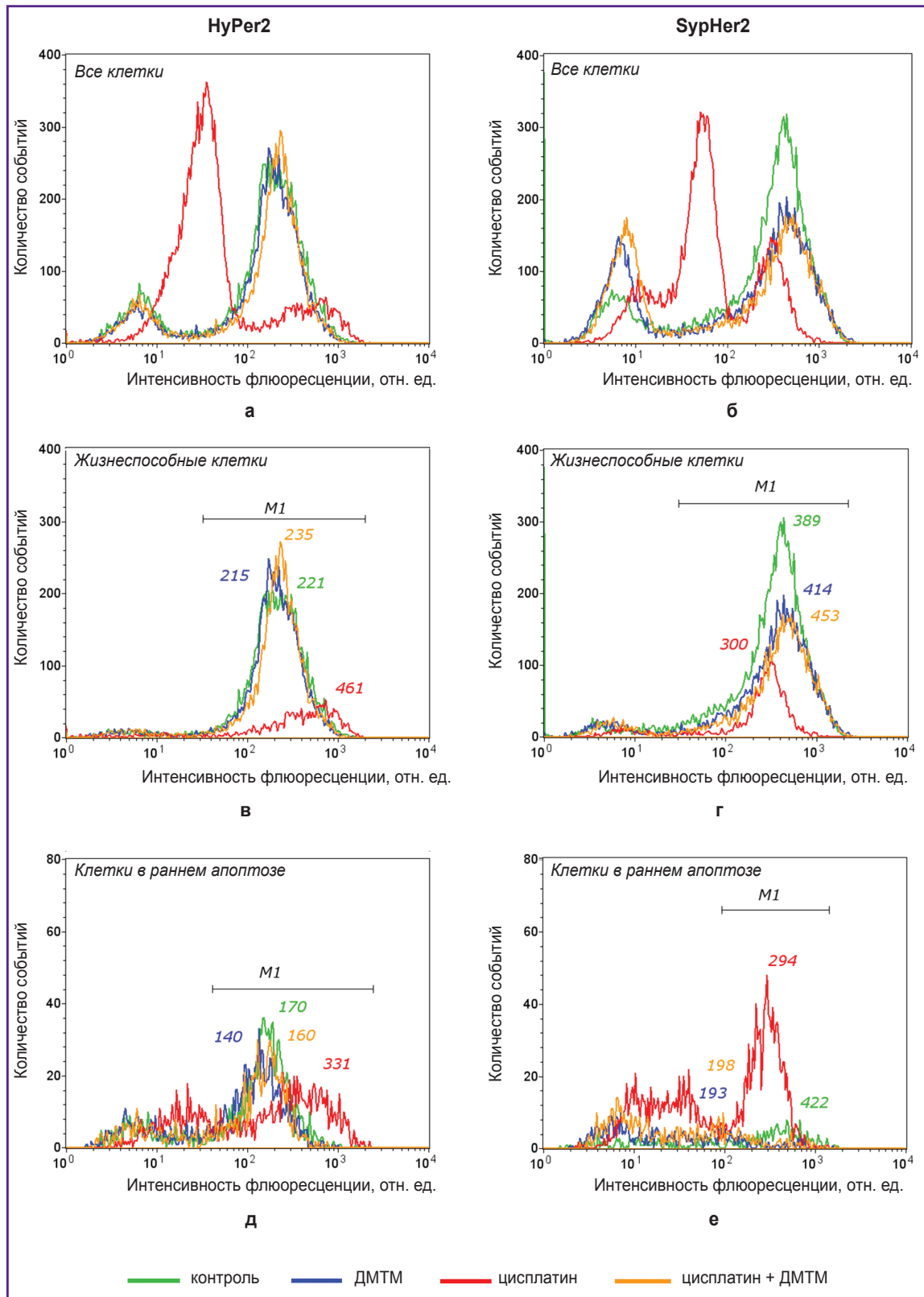
*а* — без воздействия; *б* — после воздействия 16,6 мкМ цисплатина; *в* — после воздействия 15 мМ ДМТМ; *г* — после воздействия 16,6 мкМ цисплатина и ДМТМ в концентрации 15 мМ; Инкубация в течение 24 ч; жизнеспособные клетки располагаются в левом нижнем квадранте; клетки, претерпевающие ранний апоптоз, — в правом нижнем квадранте; мертвые клетки — в левом и правом верхних квадрантах

сенсора HyPer2 до 235 отн. ед., однако для SypHer2 такого снижения не наблюдалось (453 отн. ед.). В обоих случаях характер пика флуоресценции у проб с добавлением ДМТМ подобен таковому у контрольных клеток.

В популяциях клеток, проходящих стадию раннего апоптоза, у обеих линий (см. рис. 4, д, е) добавление ДМТМ вызвало уменьшение медианного значения интенсивности флуоресценции. Добавление цисплатина к клеткам HeLa Kyoto-HyPer2 вызвало увеличение медианного значения почти вдвое — с 170 до 331 отн. ед., в то время как такое же добавление препарата к клеткам HeLa Kyoto-SypHer2 приводило

к значительному снижению медианного значения интенсивности — с 422 до 294 отн. ед. Одновременная инкубация с ДМТМ и цисплатином вызвала уменьшение медианного значения интенсивности флуоресценции ниже медианных значений клеток, обработанных только цисплатином. Данный эффект наблюдался как у клеточной линии HeLa Kyoto-HyPer2 — 160 отн. ед., так и у линии HeLa Kyoto-SypHer2 — 198 отн. ед.

Следует отметить, что пики всех проб клеток, подвергшихся одновременной инкубации с ДМТМ и цисплатином, имеют схожий характер с пиками проб клеток, обработанных лишь ДМТМ.



**Рис. 4.** Гистограммы флюоресценции HyPer2 (а, в, д) и SypHer2 (б, г, е) при действии цисплатина и/или ДМТМ, построенные для различных клеточных популяций: а, б — для всех клеток; в, г — для жизнеспособных клеток; д, е — для клеток в стадии раннего апоптоза; выделение клеточных популяций проведено на основе распределения клеток по интенсивности флюоресценции 7-AAD и ФЭ-Аннексина V, приведенного на рис. 2, 3; M1 — область оценки медианного значения интенсивности флюоресценции сенсоров

## Обсуждение

Анализ диаграмм клеток HeLa Kyoto–HyPer2 и HeLa Kyoto–SypHer2 после окрашивания трипановым синим (см. рис. 1) показал, что реакции обеих клеточных линий на добавление цисплатина и/или ДМТМ имеют схожий характер: инкубация в течение 24 ч с 16,6 мкМ цисплатина приводит к гибели около 50% клеток. Это действие препарата можно нейтрализовать добавлением в инкубационную среду 15 мМ ДМТМ. Ловушка АФК ДМТМ, добавленная к цисплатину, значительно повышает выживаемость обработанных препаратом клеток, свидетельствуя о том, что увеличение уровня внутриклеточных АФК опосредует вызываемую цисплатином гибель опухолевых клеток. Добавление только ДМТМ к клеткам не вызывает существенных изменений жизнеспособности.

Распределение клеток обеих клеточных линий по интенсивности флюоресценции 7-AAD и ФЭ–Аннексина V (см. рис. 2, 3) также свидетельствует о схожести их реакций на цисплатин, доказывая, что отличия в строении сенсоров влияют незначительно на функциональное состояние клеток. Следует отметить, что у обеих клеточных линий погибающие клетки в подавляющем большинстве сначала перемещались из области, характерной для живых клеток, в область диаграммы, характерную для раннего апоптоза, а лишь затем поднимались в область мертвых клеток. Это свидетельствует о том, что вызванная цисплатином гибель идет в большей степени по пути апоптоза, а не некроза. Подобные результаты — инициация апоптоза в опухолевых клетках под воздействием цисплатина — были получены ранее в ряде исследований [4, 21, 26]. Также имеются работы, в которых обработка цисплатином приводила к некрозу или апоптозу и некрозу одновременно в одной и той же популяции опухолевых клеток [27, 28]. Существует предположение, что в зависимости от уровня повреждения клеток, вызванного цисплатином, некроз может возникать либо непосредственно, либо как следствие незавершенной или дефектной апоптотической программы [29–32]. При цитофлуориметрии, так же как и при окрашивании трипановым синим, выявлено значительное увеличение количества жизнеспособных клеток при добавлении в инкубационную среду ДМТМ одновременно с цисплатином. Поскольку добавление ДМТМ приводило к значительному снижению доли мертвых клеток и не увеличивало при этом процент клеток в стадии раннего апоптоза, можно сделать вывод о протекторной роли ДМТМ в отношении клеток, обработанных цисплатином. Полученные результаты согласуются с работами других исследователей, показывающими способность ДМТМ уменьшать накопление синглетного кислорода, гидроксильного радикала [17],  $H_2O_2$  [18] и блокировать активацию белка p53, что приводит к ослаблению продукции p53-зависимого модулятора апоптоза альфа (PUMA- $\alpha$ ) и подавлению митохондриального пути апоптоза во время лечения цисплатином [16, 21].

Использование специфичного сенсора HyPer2 позволяет оценить вклад  $H_2O_2$  в ряду других АФК в процесс гибели опухолевых клеток при воздействии цисплатина.

Отмеченное на гистограммах флюоресценции HyPer2 увеличение интенсивности флюоресценции обработанных цисплатином клеток по сравнению с контролем и отсутствие такого повышения в экспериментах на клетках с SypHer2 (см. рис. 4) свидетельствует о значительном повышении количества  $H_2O_2$  как в жизнеспособных, так и в апоптотических клетках. В ряде работ [4, 5, 33] было показано, что накопление внутриклеточного  $H_2O_2$  в значительной степени способствует усиленному апоптозу, хотя и не исключает другие механизмы его инициации.

Так, например,  $H_2O_2$ , как и ряд других АФК, являющихся важными компонентами клеточной сигнализации, может вызвать и повреждение ДНК [33]. Следует обратить внимание, что инкубация с цисплатином клеток HeLa Kyoto–SypHer2 не только не повышает, но даже приводит к снижению флюоресценции сенсора. Поскольку сенсор SypHer2 чувствителен к изменениям pH, как и HyPer2, но, в отличие от него, не чувствителен к изменениям уровня  $H_2O_2$ , а реакции сенсоров разнонаправлены, то видимое увеличение флюоресценции чувствительного к  $H_2O_2$  сенсора было частично ослаблено внутриклеточными изменениями pH. Добавление ДМТМ к обработанным цисплатином клеткам приводит к снижению уровня  $H_2O_2$  до соотносимых с контролем значений, при этом выравнивает pH внутри клетки. Следует также учесть, что, поскольку ДМТМ в основном захватывает гидроксильный радикал, мы можем наблюдать опосредованную реакцию, вызванную удалением предшественника пероксида водорода.

## Заключение

В данной работе доказано участие  $H_2O_2$  в ответе опухолевых клеток HeLa Kyoto на цитотоксическое воздействие цисплатином. Удаление  $H_2O_2$ , вызванное присутствием ловушки АФК ДМТМ, приводит к значительному росту жизнеспособности обработанных цисплатином клеток, соизмеримому с жизнеспособностью клеток, не подвергшихся воздействию препарата. Вызываемая цисплатином гибель связана в первую очередь с активацией апоптотического пути, инициированного увеличением количества АФК, в том числе  $H_2O_2$ .

**Благодарности.** Авторы благодарны за помощь в проведении экспериментов к.б.н. И.В. Балалаевой и д.м.н. Е.В. Загайновой, а также за полезные обсуждения — к.ф.-м.н. М.Ю. Кириллину.

**Финансирование исследования.** Исследование проведено за счет средств проекта Российского фонда фундаментальных исследований №16-34-01112.

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



Литература/References

1. Florea A.-M., Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* 2011; 3(4): 1351–1371, <https://doi.org/10.3390/cancers3011351>.
2. Dasari S., Tchounwou P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014; 740: 364–378, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
3. Marullo R., Werner E., Degtyareva N., Moore B., Altavilla G., Ramalingam S.S., Doetsch P.W. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One* 2013; 8(11): e81162, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081162>.
4. He F., Wang Q., Zheng X.L., Yan J.Q., Yang L., Sun H., Hu L.N., Lin Y., Wang X. Wogonin potentiates cisplatin-induced cancer cell apoptosis through accumulation of intracellular reactive oxygen species. *Oncol Rep* 2012; 28(2): 601–605, <https://doi.org/10.3892/or.2012.1841>.
5. Wang L., Chanvorachote P., Toledo D., Stehlik C., Mercer R.R., Castranova V., Rojanasakul Y. Peroxide is a key mediator of Bcl-2 down-regulation and apoptosis induction by cisplatin in human lung cancer cells. *Mol Pharmacol* 2008; 73(1): 119–127, <https://doi.org/10.1124/mol.107.040873>.
6. Ahmad K.A., Iskandar K.B., Hirpara J.L., Clement M.-V., Pervaiz S. Hydrogen peroxide-mediated cytosolic acidification is a signal for mitochondrial translocation of Bax during drug-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Res* 2004; 64(21): 7867–7878, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-0648>.
7. Distelhorst C.W., Lam M., McCormick T.S. Bcl-2 inhibits hydrogen peroxide-induced ER Ca2 pool depletion. *Oncogene* 1996; 12(10): 2051–2055.
8. Yamakawa H., Ito Y., Naganawa T., Banno Y., Nakashima S., Yoshimura S., Sawada M., Nishimura Y., Nozawa Y., Sakai N. Activation of caspase-9 and -3 during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of PC12 cells independent of ceramide formation. *Neural Res* 2000; 22(6): 556–564, <https://doi.org/10.1080/01616412.2000.11740718>.
9. Guo H., Aleyasin H., Dickinson B.C., Haskew-Layton R.E., Ratan R.R. Recent advances in hydrogen peroxide imaging for biological applications. *Cell Biosci* 2014; 4(1): 64, <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-64>.
10. 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, <https://doi.org/10.1038/nmeth866>.
11. Kaminsky V.O., Piskunova T., Zborovskaya I.B., Tchekvina E.M., Zhivotovsky B. Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and -independent apoptosis by stimulating ROS formation. *Autophagy* 2012; 8(7): 1032–1044, <https://doi.org/10.4161/auto.20123>.
12. Brilkina A.A., Peskova N.N., Dudenkova V.V., Gorokhova A.A., Sokolova E.A., Balalaeva I.V. Monitoring of hydrogen peroxide production under photodynamic treatment using protein sensor HyPer. *J Photochem Photobiol B* 2018; 178: 296–301, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.11.020>.
13. 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 Egf. In: *Methods in molecular biology*. Humana Press; 2008; p. 76–83, [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-129-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-129-1_6).
14. Тюрин-Кузьмин П.А. Роль пероксида водорода в регуляции поляризации и миграции фибробластов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М; 2011. Tyurin-Kuzmin P.A. *Rol peroksida vodoroda v regulatsii polarizatsii i migratsii fibroblastov*. Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk [The role of hydrogen peroxide in the regulation of polarization and migration of fibroblasts. PhD Thesis]. Moscow; 2011.
15. Belova A.S., Orlova A.G., Balalaeva I.V., Antonova N.O., Maslennikova A.V., Mishina N.M., Zagaynova E.V. Hydrogen peroxide detection in viable and apoptotic tumor cells under action of cisplatin and bleomycin. *Photonics & Lasers in Medicine* 2016; 5(2): 113–121, <https://doi.org/10.1515/plm-2015-0047>.
16. Floriano-Sánchez E., Villanueva C., Medina-Campos O.N., Rocha D., Sánchez-González D.J., Cárdenas-Rodríguez N., Pedraza-Chaverri J. Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxyxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic Res* 2006; 40(5): 523–533, <https://doi.org/10.1080/10715760500419365>.
17. Kim S., Yamamoto K., Nakamura Y., Otoyoy Y., Yamatodani A. A possible mechanism of cisplatin-induced tumor necrosis factor (TNF)-α production in murine macrophages. *Pharmacology & Pharmacy* 2013; 4(2): 146–151, <https://doi.org/10.4236/pp.2013.42021>.
18. Curtis W.E., Muldrow M.E., Parker N.B., Barkley R., Linas S.L., Repine J.E. N,N'-dimethylthiourea dioxide formation from N,N'-dimethylthiourea reflects hydrogen peroxide concentrations in simple biological systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(10): 3422–3425, <https://doi.org/10.1073/pnas.85.10.3422>.
19. Toth K.M., Clifford D.P., Berger E.M., White C.W., Repine J.E. Intact human erythrocytes prevent hydrogen peroxide-mediated damage to isolated perfused rat lungs and cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Clin Invest* 1984; 74(1): 292–295, <https://doi.org/10.1172/jci111414>.
20. Santos N.A., Bezerra C.S., Martins N.M., Curti C., Bianchi M.L., Santos A.C. Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 61(1): 145–155, <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0459-y>.
21. Jiang M., Wei Q., Pabla N., Dong G., Wang C.Y., Yang T., Smith S.B., Dong Z. Effects of hydroxyl radical scavenging on cisplatin-induced p53 activation, tubular cell apoptosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 2007; 73(9): 1499–1510, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.01.010>.
22. dos Santos N.A., Martins N.M., Curti C., Pires Bianchi M. de L., dos Santos A.C. Dimethylthiourea protects against mitochondrial oxidative damage induced by cisplatin in liver of rats. *Chem Biol Interact* 2007; 170(3): 177–186, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.07.014>.
23. 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, [https://doi.org/10.1016/s0022-2143\(03\)00111-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2143(03)00111-2).
24. Shirmanova M.V., Druzhkova I.N., Lukina M.M., Matlashov M.E., Belousov V.V., Snopova L.B., Prodanetz N.N.,

- Dudenkova V.V., Lukyanov S.A., Zagaynova E.V. Intracellular pH imaging in cancer cells in vitro and tumors in vivo using the new genetically encoded sensor SypHer2. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850(9): 1905–1911, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.05.001>.
25. Belova A.S., Orlova A.G., Briikina A.A., Maslennikova A.V. The sensitivity of HeLa Kyoto cell line transfected with sensor HyPer2 to cisplatin. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2014; 6(4): 7–13.
26. Brozovic A., Ambriović-Ristov A., Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol* 2010; 40(4): 347–359, <https://doi.org/10.3109/10408441003601836>.
27. 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, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr098>.
28. Pestell K.E., Hobbs S.M., Tittley J.C., Kelland L.R., Walton M.I. Effects of p53 status on sensitivity to platinum complexes in a human ovarian cancer cell line. *Mol Pharmacol* 2000; 57(3): 503–511, <https://doi.org/10.1124/mol.57.3.503>.
29. Segal-Bendirdjian E., Jacquemin-Sablon A. Cisplatin resistance in a murine leukemia cell line is associated with a defective apoptotic process. *Exp Cell Res* 1995; 218(1): 201–212, <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1148>.
30. Gonzalez V.M., Fuenfies M.A., Alonso C., Perez J.M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001; 59(4): 657–663, <https://doi.org/10.1124/mol.59.4.657>.
31. Cepeda V., Fuenfies M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Pérez J.M. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 2007; 7(1): 3–18, <https://doi.org/10.2174/187152007779314044>.
32. Eguchi Y., Shimizu S., Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 1997; 57(10): 1835–1840.
33. Tenopoulou M., Doulias P.T., Barbouti A., Brunk U., Galaris D. Role of compartmentalized redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem J* 2005; 387(3): 703–710, <https://doi.org/10.1042/bj20041650>.