

На правах рукописи



Неруш Анастасия Сергеевна

**Участие пероксида водорода в процессе гибели опухолевых клеток при
воздействии цисплатина**

1.5.2 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2021

Работа выполнена на базе кафедры биофизики Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» и на базе Лаборатории биофотоники Отдела радиофизических методов в медицине Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики Российской академии наук».

Научный руководитель:	Орлова Анна Геннадьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории биофотоники Отдела радиофизических методов в медицине Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики Российской академии наук»
Официальные оппоненты:	Хлебцов Борис Николаевич, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории нанобиотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук Маркова Светлана Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН - обособленного подразделения Федерального исследовательского центра "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук"
Ведущая организация:	Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «17» декабря 2021 года в 15:00 на заседании диссертационного совета 24.2.340.06 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/files/2021/1165/diss-Nerush-1165.pdf>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Акинчиц Елена Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В современной экспериментальной онкологии одной из особенно актуальных задач остается разработка более эффективных и менее опасных лекарственных препаратов. Для уменьшения побочных эффектов в создании таких препаратов большое внимание уделяется особенностям опухолевых клеток в сравнении с нормальными. Вследствие этого большое значение приобретают сведения об избыточной продукции активных форм кислорода (АФК) в опухолевых клетках (*Matés, Segura et al., 2012*), необходимых для клеточной пролиферации и роста (*Pavlova and Thompson, 2016*). Первоначально АФК рассматривали как побочные продукты метаболизма клеток, способные вызывать повреждения, окислительный стресс и старение организма (*Harman, 1956*). Однако в настоящее время показано их участие в регулировании сигнальных механизмов нормальных физиологических реакций (*Owusu-Ansah and Banerjee, 2009; Juntilla, Patil et al., 2010*). В зависимости от концентрации, АФК могут играть разные роли в возникновении и развитии рака: низкие концентрации АФК способствуют активации и дальнейшему распространению клеточного сигнала, в то время как высокие дозы способны индуцировать развитие апоптоза (*Toyokuni, Okamoto et al., 1995; Cairns, Harris et al., 2011; Schieber and Chandel, 2014; Mu and Liu, 2017*).

Степень разработанности темы исследования

Среди всех АФК наибольший интерес вызывает пероксид водорода (H_2O_2). К настоящему времени накопилось большое количество исследований, указывающих на его роль в клеточной пролиферации и миграции клеток (*Zanetti, Katusic et al., 2002; Burdon, 1995; Polytarchou, Hatziapostolou et al., 2005; San Martin and Griendling, 2010*), в повышенном ангиогенезе (*Arbiser, Petros et al., 2002; Qian, Luo et al., 2003*), передаче апоптотического сигнала (*Ahmad, Iskandar et al., 2004; Mizutani, Tada-Oikawa et al., 2005; Bretón-Romero and Lamas, 2013*), злокачественной трансформации и метастазировании (*Arnold, Shi et al., 2001; Nelson, Ranganathan et al., 2003; Nishikawa, Tamada et al., 2004*). Все эти данные наряду со способностью легко проникать через плазматические мембраны позволяют рассматривать H_2O_2 в качестве вторичного мессенджера (*Stone and Yang, 2006; Veal, Day et al., 2007; Ткачук, Тюрин et al., 2012; Rani, Mishra et al., 2015*). Кроме того, некоторые исследования показали, что опухолевые клетки обладают повышенной восприимчивостью к H_2O_2 , а определенные концентрации H_2O_2 способны вызывать гибель опухолевых, но не нормальных клеток (*Lopez-Lázaro, 2007; Ткачук, Тюрин и др., 2012; Lopez-Lazaro, 2016*).

В то же время, есть работы, подтверждающие, что увеличение внутриклеточного уровня АФК, в том числе H_2O_2 , при воздействии химиотерапевтических препаратов, может являться

эффективным способом уничтожения раковых клеток, а также помочь в борьбе с устойчивостью опухолей к подобным препаратам (*Mattson, Ahmad et al., 2009; Okon and Zou, 2015*).

Одним из активно изучаемых противоопухолевых агентов, способных вызывать повышенное образование АФК, является цисплатин. Цисплатин относится к группе платиносодержащих препаратов и широко используется в лечении злокачественных новообразований (*Florea and Büsselberg, 2011*).

Данная работа посвящена изучению взаимосвязей между изменением внутриклеточного уровня пероксида водорода в обработанных цисплатином клетках и стадиями клеточной гибели. Полученные сведения могут быть использованы в дальнейшем изучении пероксида водорода в качестве компонента альтернативного пути избирательного воздействия на гибель опухолевых клеток при химиотерапии.

Цели и задачи

Целью данной работы являлось исследование роли пероксида водорода в цисплатин-индуцированной гибели клеток HeLa Kyoto.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучение влияния цисплатина на жизнеспособность опухолевых клеток HeLa Kyoto *in vitro*.
2. Разработка методики специфичной оценки уровня H_2O_2 одновременно с механизмами клеточной гибели.
3. Анализ дозо-временной динамики цисплатин-индуцированных изменений уровня H_2O_2 в живых и апоптотических клетках.
4. Изучение влияния цисплатина на жизнеспособность и уровень H_2O_2 в условиях добавления ловушек АФК.

Научная новизна

Разработана новая методика дискретной оценки уровня H_2O_2 в популяциях жизнеспособных и апоптотических клеток. Данная методика на основе проточной цитофлуориметрии предполагает использование культур с генетически-кодируемыми сенсорами HyPer2 и SypHer2 в сочетании с флуоресцентными красителями на апоптоз. Показано, что цисплатин-индуцированное накопление H_2O_2 в опухолевых клетках происходит раньше экстернализации фосфатидилсерина.

Пероксид водорода может быть рассмотрен как индуктор апоптоза при действии цисплатина, о чем свидетельствует одновременное возрастание концентрации H_2O_2 и

проявление ранних обратимых признаков апоптоза (потеря мембранного потенциала митохондрий), которые предотвращаются на фоне ловушек АФК.

Научно-практическая значимость работы

Разработанная методика может быть использована для оценки изменений внутриклеточных уровней H_2O_2 и pH, а также механизмов клеточной гибели при воздействии различных противоопухолевых агентов и разнообразных повреждающих факторов на исследуемые клеточные культуры.

Методика может быть применена для фундаментальных исследований, направленных на выявление особенностей редокс-статуса опухолевых клеток и его изменений при различных внешних условиях, а также определения точных путей и механизмов влияния H_2O_2 на процессы апоптоза в опухолевых культурах.

Полученные в работе данные могут послужить основой для разработки тестирования *in vitro* новых менее токсичных и более эффективных противоопухолевых препаратов.

Методология и методы исследования

Работа проводилась на клетках карциномы шейки матки HeLa Kyoto, прошедших трансфекцию флуоресцентными сенсорами HyPer2 или SypHer2 (предоставлены Институтом биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова), а также не подвергшихся данной трансфекции. Сенсор HyPer2, обладающий чувствительностью к пероксиду водорода и pH, использовался в паре с сенсором SypHer2, чувствительным только к pH. Для определения жизнеспособности клеточных линий и подбора доз препарата при воздействии цисплатина применялись метилтетразолиевый тест и метод окрашивания трипановым синим.

Для определения уровня H_2O_2 в клетках на разных стадиях клеточной гибели использовалась методика проточной цитофлуориметрии с использованием набора на апоптоз PE Annexin V apoptosis detection kit I. Набор красителей позволяет разделить клетки с поврежденной мембраной (7-аминоактиномицин D, 7-AAD) и/или с экстернализацией фосфатидилсерина от жизнеспособных клеток. Кроме того, использовался флуоресцентный краситель, маркирующий изменение мембранного потенциала митохондрий (этиловый эфир тетраметилродамина, TMRE), являющегося показателем более ранней стадии апоптоза.

Для подтверждения роли H_2O_2 в ответе опухолевых клеток на цисплатин использовалась ловушка АФК: N-ацетил-L-цистеин (NAC).

Личный вклад автора

В диссертации представлены результаты исследований, выполненных самим автором, включая постановку задач, планирование и проведение экспериментов, анализ и интерпретацию полученных результатов. Также автор совместно с соавторами участвовал в написании научных статей и апробации полученных результатов на семинарах, конференциях и симпозиумах.

Положения, выносимые на защиту

1. Пероксид водорода является индуктором апоптоза опухолевых клеток при действии цисплатина.
2. Динамика изменения уровня пероксида водорода в опухолевых клетках дифференциальна для живых и апоптотических клеток.
3. Повышение уровня пероксида водорода происходит на фоне потери мембранного потенциала митохондрий и предшествует экстернализации фосфатидилсерина.
4. Добавление ловушек АФК предотвращает цисплатин-индуцированное повышение уровня H_2O_2 в опухолевых клетках, способствуя сохранению митохондриального мембранного потенциала, а также предотвращая выход фосфатидилсерина на внешнюю поверхность плазматической мембраны и гибель клеток.

Соответствие паспорту научной специальности.

Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности 1.5.2 – биофизика.

Степень достоверности и апробация работы

Основные результаты работы были представлены на следующих всероссийских и международных конференциях: Международной конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино, 2012); IV Съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012); V Всероссийском с международным участием медико-биологическом конгрессе молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012» (Тверь, 2012); IV Международном симпозиуме «Topical problems of biophotonics – 2013» (Нижний Новгород – Ярославль – Казань - Нижний Новгород, 2013); «Форуме молодых ученых 2013» (Нижний Новгород, 2013); VI Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине» (Троицк, Москва, 2013); VII Съезде Российского фотобиологического общества (Шепси, 2014); Международной конференции «SPIE BiOS» (Сан-Франциско, 2014); V Международном симпозиуме «Topical problems of biophotonics – 2015» (Нижний Новгород – Елабуга – Нижний Новгород, 2015); 7-ом Финско-Русском симпозиуме «Photonics and Laser Symposium» (Саратов, 2015); Международной конференции

«Conference on advanced fluorescence imaging methods» (Сочи, Дагомыс, 2016); Международной конференции «OSA Biomedical Optics 2016» (Форт-Лодердейл, 2016); VI Международном симпозиуме «Topical problems of biophotonics – 2017» (Санкт-Петербург – Нижний Новгород, 2017); 17-ом Международном конгрессе «Congress of the European Society for Photobiology» (Пиза, 2017); Международной конференции «SPIE ECBO» (Мюнхен, 2019).

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 22 научные работы, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в перечень ВАК, 1 патент, 15 тезисов конференций (в том числе 3 в Web of Science).

Конкурсная поддержка работы

Проведенные исследования были выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 13-04-97165, 16-34-01112).

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 200 страницах печатного текста и содержит 49 рисунков, 2 таблицы. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 549 источников, из них 526 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 посвящена обзору литературы по следующим темам: особенности опухолевых клеток; типы клеточной гибели, апоптоз, его стадии и особенности, способы определения; активные формы кислорода, основные типы АФК, пероксид водорода, защита клетки от АФК, способы определения АФК; цисплатин, основное действие цисплатина, сигнальные каскады, цисплатин и пероксид водорода.

В **главе 2** перечислены использованные в работе оборудование, культуральная посуда и реактивы, а также описаны методики исследования.

В работе были использованы клетки карциномы шейки матки HeLa Kyoto, трансфицированные сенсорами HyPer2 или SypHer2, а также не подвергшиеся данной трансфекции.

Определение жизнеспособности клеточных линий

Метилтетразолиевый тест (MTT-тест). Для проведения MTT-теста клетки HeLa Kyoto, HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2 подвергали воздействию цисплатина (Тева, Израиль) в концентрациях от 0 до 50 мкМ. После инкубации с MTT измеряли оптическую плотность полученного раствора формазана, растворенного ДМСО на планшетном спектрофотометре Synergy MX (BioTek, США).

Окрашиванию трипановым синим подвергались клетки HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2, предварительно обработанные цисплатином в концентрации 8,3 мкМ - IC₅₀ (концентрация, ингибирующая 50% клеток по результатам MTT-теста). Экспозиция с препаратом составляла от 0 до 24 часов, подсчет окрашенных и неокрашенных клеток производился под микроскопом в камере Горяева каждые 2 часа.

Изучение динамики уровня H₂O₂ на разных стадиях клеточной гибели

Клетки HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2 подвергали воздействию цисплатина в концентрациях: 4,2 мкМ, 8,3 мкМ, 16,6 мкМ, 33,2 мкМ, 83,0 мкМ, 200 мкМ в течение 12 и 24 часов. Окрашивали с использованием набора на апоптоз PE Annexin V apoptosis detection kit I (BD Biosciences, США). Анализ флуоресценции красителей и сенсоров проводился при помощи проточного цитофлуориметра FACSCalibur (BD, США). Дополнительно исследовали воздействие цисплатином в концентрациях 0; 4,2 мкМ; 8,3 мкМ; 16,6 мкМ; 33,2 мкМ; 83,0 мкМ при 18-часовой инкубации, анализ флуоресценции красителей и сенсоров осуществлялся при помощи проточного цитофлуориметра-сортера FACSAria III (BD, США).

Изучение динамики уровня H₂O₂ в условиях использования ловушек АФК

Экстернализация фосфатидилсерина. Клетки HeLa Kyoto-HyPer2 подвергали воздействию 16,6 мкМ цисплатина с добавлением 5,0 мМ NAC (Sigma-Aldrich, США) и окрашивали набором на апоптоз PE Annexin V apoptosis detection kit I (BD Biosciences, США). Инкубация длилась 18 часов, регистрация флуоресценции осуществлялась при помощи проточного цитофлуориметра-сортера FACSAria III (BD, США).

Определение состояния мембранного потенциала митохондрий. Клетки HeLa Kyoto-HyPer2 обрабатывали одновременно 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC (Sigma-Aldrich, США). После 18 часов инкубации клетки обрабатывали TMRE (BD Biosciences, США) и 7-AAD (BD Biosciences, США). Анализ образцов проводили с использованием цитофлуориметра-сортера FACSAria III (BD, США).

Глава 3 содержит изложение и обсуждения результатов исследования.

Определение жизнеспособности клеточных линий

Определение жизнеспособности по активности НАДФ-Н-зависимых клеточных оксидоредуктазных ферментов. По данным МТТ-теста были построены кривые зависимости жизнеспособности клеточных линий HeLa Kyoto, HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2 от концентрации цисплатина (рисунок 1).

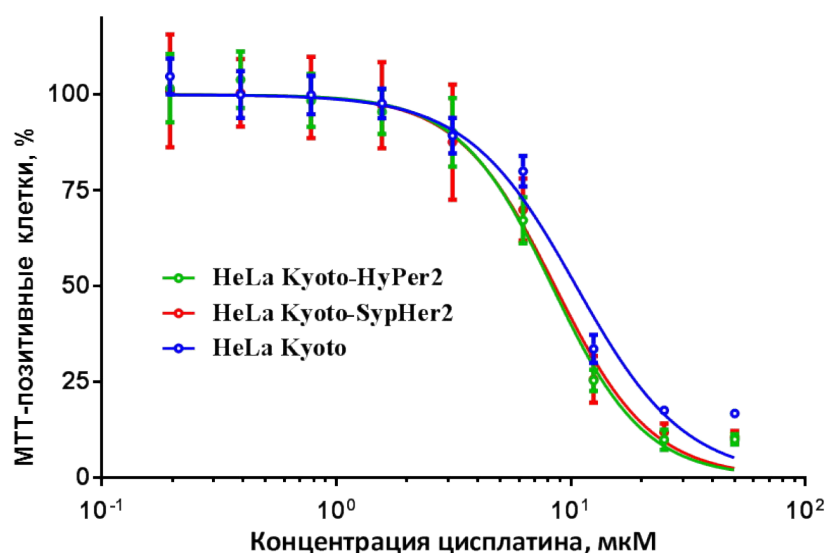


Рисунок 1. Жизнеспособность опухолевых культур HeLa Kyoto, HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2 при воздействии 0–50 мкМ цисплатина. Данные МТТ-теста каждой из исследуемых культур представляли в виде среднего значения $\pm$ СОС. Для HeLa Kyoto проведено 4 эксперимента в трехкратной повторности, для HeLa Kyoto-HyPer2 8 экспериментов в трехкратной повторности, для HeLa Kyoto-SypHer2 7 экспериментов в трехкратной повторности

Сравнение кривых показало, что клеточные линии с генетически кодируемыми сенсорами HyPer2 и SypHer2 отвечают на повышение концентрации препарата практически идентично, (IC_{50}) их клеток сходны (таблица 1). Необходимо отметить, что, несмотря на схожую динамику ответа, чувствительность клеточной линии, не содержащей генетически-кодируемых сенсоров, была выше, IC_{50} цисплатина для неё была сопоставима с представленной в статье (Komleva, Lapshina et al., 2015).

Таблица 1

Основные характеристики сравнения кривых жизнеспособности клеточных линий

Клеточная линия	IC_{50} , мкМ	95% доверительный интервал IC_{50} , мкМ	коэффициент Хилла	95% доверительный интервал коэффициента Хилла
HeLa Kyoto-HyPer2	8,30	[7,3; 9,45]	-2,196	[-2,739; -1,652]
HeLa Kyoto-SypHer2	8,54	[7,4; 9,81]	-2,108	[-2,651; -1,566]
HeLa Kyoto	10,53	[8,4; 13,19]	-1,876	[-2,583; -1,170]

Для анализа сходства ответов трех клеточных линий был применен критерий Фишера, показавший, что жизнеспособность всех трех клеточных линий может быть описана одной кривой ($p > 0,05$) (таблица 2), поэтому для расчета рабочих концентраций цисплатина была использована IC_{50} , определенная для HeLa Kyoto-HyPer2.

Таблица 2

Сравнение кривых жизнеспособности по Критерию Фишера (F-тест)

Клеточная линия	HeLa Kyoto-HyPer2	HeLa Kyoto-SypHer2	HeLa Kyoto	Все клеточные линии
HeLa Kyoto-HyPer2		p = 0,92	p = 0,11	
HeLa Kyoto-SypHer2	p = 0,92		p = 0,19	
HeLa Kyoto	p = 0,11	p = 0,19		
Все клеточные линии				p = 0,18

Уменьшение количества МТТ в клетках может рассматриваться как показатель «окислительно-восстановительной активности клеток» (*Marshall, Goodwin et al., 1995*). Полученная в нашей работе небольшая разница в чувствительности клеточных линий может быть связана с наличием флуоресцентного белка, воздействующего на гомеостаз клетки (*Goto et al., 2003, Greenbaum et al., 2000*).

Определение жизнеспособности по целостности плазматической мембраны осуществлялось при помощи окрашивания трипановым синим. При воздействии цисплатином в концентрации 8,3 мкМ в течение всего времени исследования количество живых клеток для обеих клеточных линий колебалось в незначительных пределах и через 24 часа было соизмеримо с таковым в начальный момент воздействия. В контроле количество живых клеток увеличивалось с течением времени и через 24 часа возрастало примерно в 2,2 раза (рисунок 2).

Количество мертвых клеток с увеличением длительности инкубации для обеих клеточных линий увеличивалось как в пробах с цисплатином, так и в пробах без цисплатина. Однако при рассмотрении доли мертвых клеток очевидно, что изменения со временем в контрольных пробах незначительны. Эти данные свидетельствуют о том, что воздействие цисплатином в концентрации, равной IC₅₀, приводит в большей степени к остановке клеточного деления, чем к клеточной гибели. Следовательно, низкие концентрации цисплатина в большей степени вызывают цитостатический эффект, в то время как высокие концентрации препарата преимущественно обладают цитотоксическим действием. Способность цисплатина и других платиновых комплексов останавливать клеточный цикл была продемонстрирована многими авторами (*Dasika, Lin et al., 1999; Desoize and Madoulet, 2002; Attardi, de Vries et al., 2004; Velma, Dasari et al., 2016*). Показано, что остановка в G2 фазе может играть роль в дальнейшем при запуске цисплатин-индуцированной гибели (*Sorenson and Eastman, 1988*).

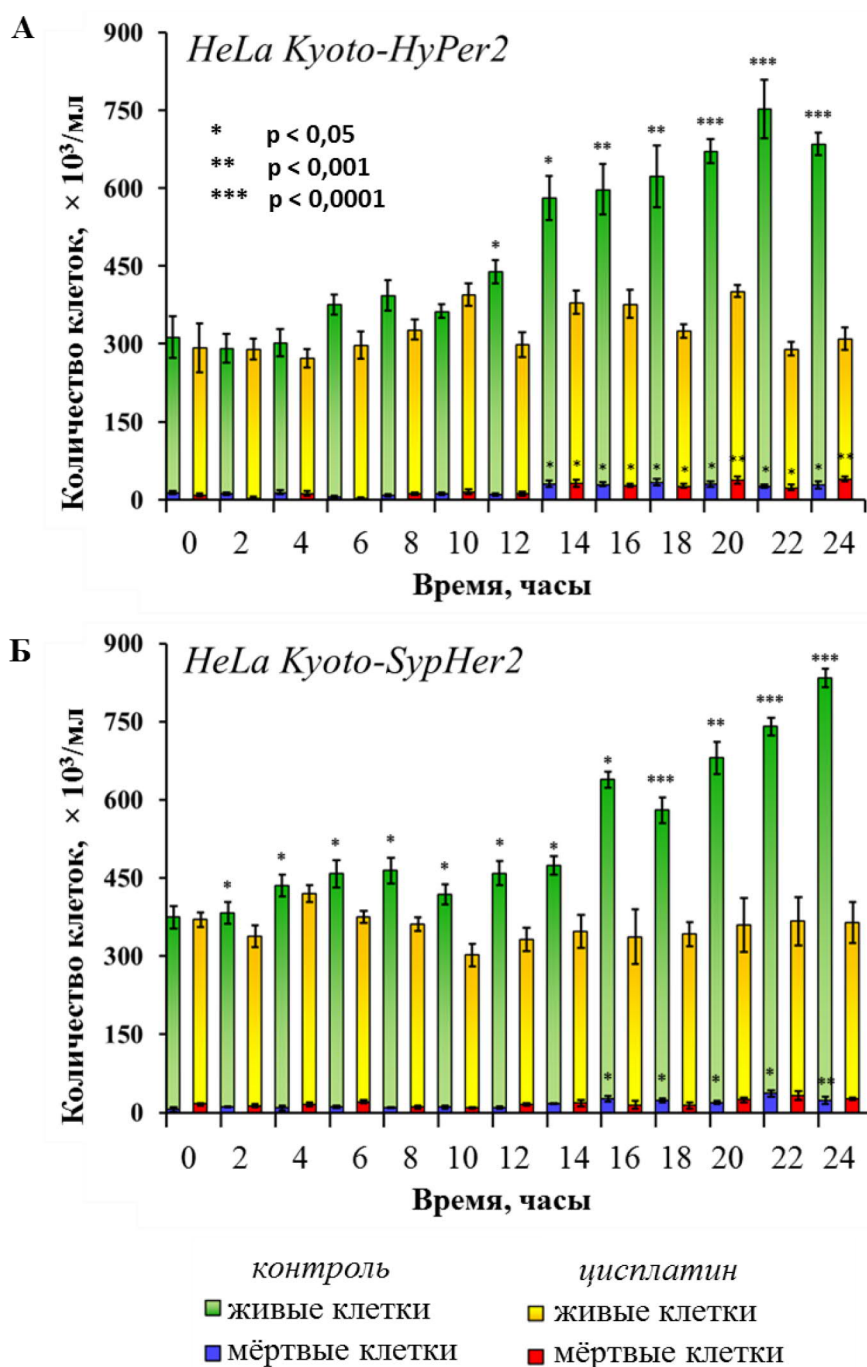


Рисунок 2. Количество жизнеспособных и мертвых клеток, определенных методом окрашивания трипановым синим при воздействии 8,3 мкМ цисплатина. (А) HeLa Kyoto-HyPer2, (Б) HeLa Kyoto-SypHer2. Графики представлены в виде средних значений и СОС для 3 экспериментов в двукратной повторности. Звездочками отмечены статистически значимые различия между значениями для обработанных и необработанных цисплатином клеток (критерий Стьюдента для независимых выборок)

Наши данные показали, что цисплатин в концентрации IC_{50} практически не приводит клетки HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2 к гибели в течение 24-х часов воздействия, следовательно, данная концентрация препарата недостаточна для изучения механизма апоптотической гибели клеток в течение первых суток после введения препарата в среду.

Разработка методики изучения уровня H_2O_2 одновременно с механизмом клеточной гибели

Разработана методика, основанная на использовании генетически-кодированных сенсоров одновременно с витальным красителем и маркерами на апоптоз и позволяющая методом проточной цитофлуориметрии определить уровень H_2O_2 отдельно в популяциях живых и

апоптотических клеток, а также осуществить контроль pH в каждой из клеточных популяций (рисунок 3).

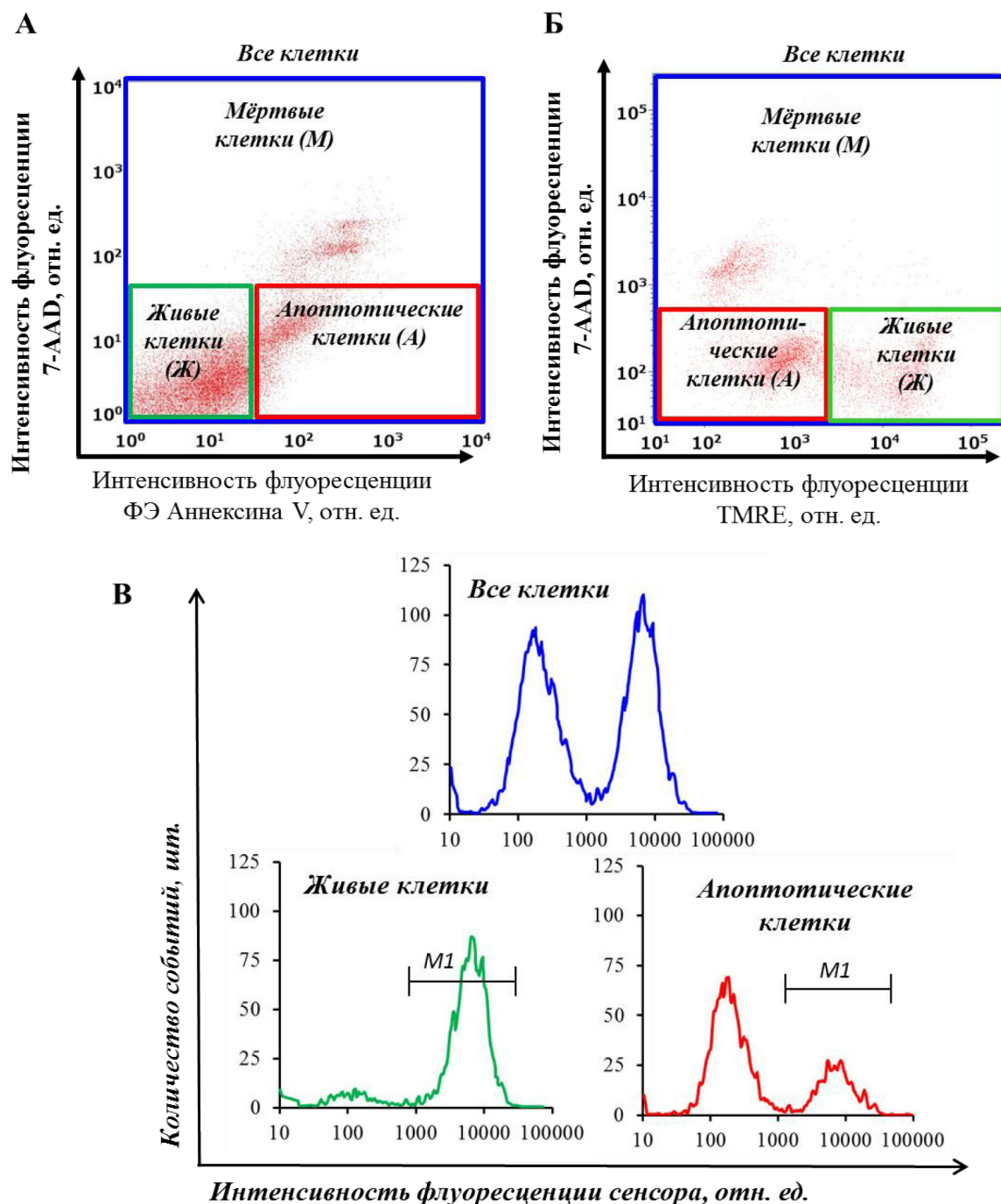


Рисунок 3. Методика распределения клеток на популяции живых, апоптотических и мертвых клеток, основанная на целостности плазматической мембраны и: (А) экстернализации ФС, (Б) изменении мембранного потенциала митохондрий. (В) Методика оценки уровня H_2O_2 и/или pH в живых и апоптотических клетках, а также во всех клетках. M1 – область флуоресценции сенсора, используемая для расчета медианного значения

Экстернализация фосфатидилсерина (ФС). Использование двух красителей ФЭ Аннексина V и 7-AAD позволило распределить все клетки на 3 популяции по степени окрашивания: 1) живые клетки – клетки, не окрашенные ни одним из красителей, 2) клетки, проходящие стадии

апоптоза – окрашенные Аннексином V, но не окрашенные 7-AAD, 3) мертвые клетки – клетки, которые окрашивались обоими красителями или окрашивались 7-AAD, но не окрашивались Аннексином V (рисунок 3А). Флуоресценция сенсоров HyPer2 или SypHer2 изучалась в популяциях живых и переживающих апоптоз клеток по отдельности. Анализ отклика сенсоров осуществлялся при помощи расчета медианного значения пика распределения клеток по интенсивности флуоресценции. Поскольку в мертвых клетках флуоресценция сенсоров была сильно снижена в связи с их вероятной утечкой через повреждённую плазматическую мембрану при подготовке клеток к проточной цитофлуориметрии, либо по причине повреждения сенсоров в мертвых клетках при данном способе пробоподготовки, либо по другой причине, уровень H_2O_2 , а также pH в данных клетках не мог быть проанализирован.

Изменение мембранного потенциала митохондрий. TMRE, использованный в сочетании с 7-AAD, также позволяет выделить 3 популяции клеток: 1) живые клетки – интенсивно окрашенные TMRE, но не окрашенные 7-AAD, 2) клетки, переживающие апоптоз - не окрашенные ни одним из красителей, 3) мертвые клетки – клетки, которые окрашивались обоими красителями или окрашивались 7-AAD, но не окрашивались TMRE (рисунок 3Б). Анализ отклика сенсоров также осуществлялся при помощи расчета медианного значения пика распределения клеток по интенсивности флуоресценции в живых и апоптотических клетках по отдельности (рисунок 3В).

Для проверки участия H_2O_2 в наблюдаемых реакциях дополнительно в обе методики были включены инкубации опухолевых культур с ловушкой АФК (NAC).

Изучение динамики уровня H_2O_2 на разных стадиях клеточной гибели

Определение стадий клеточной гибели. По мере возрастания длительности инкубации и/или концентрации препарата у обеих клеточных линий наблюдалось уменьшение количества жизнеспособных клеток и увеличение процента мертвых клеток (рисунок 4). Но лишь две концентрации препарата вызывали значительный процент апоптоза как у клеток HeLa Kyoto-HyPer2, так и у клеток HeLa Kyoto-SypHer2: 83,0 мкМ цисплатина при 12-часовом воздействии и 16,6 мкМ цисплатина при 18 часах воздействия (средний столбец на рисунке 4).

Следует обратить внимание, что концентрация 83,0 мкМ соответствует $10 \times IC_{50}$ цисплатина в изучаемых клеточных линиях и является довольно высокой концентрацией для воздействия на клеточные культуры, в то время как 16,6 мкМ соответствует $2 \times IC_{50}$ цисплатина.

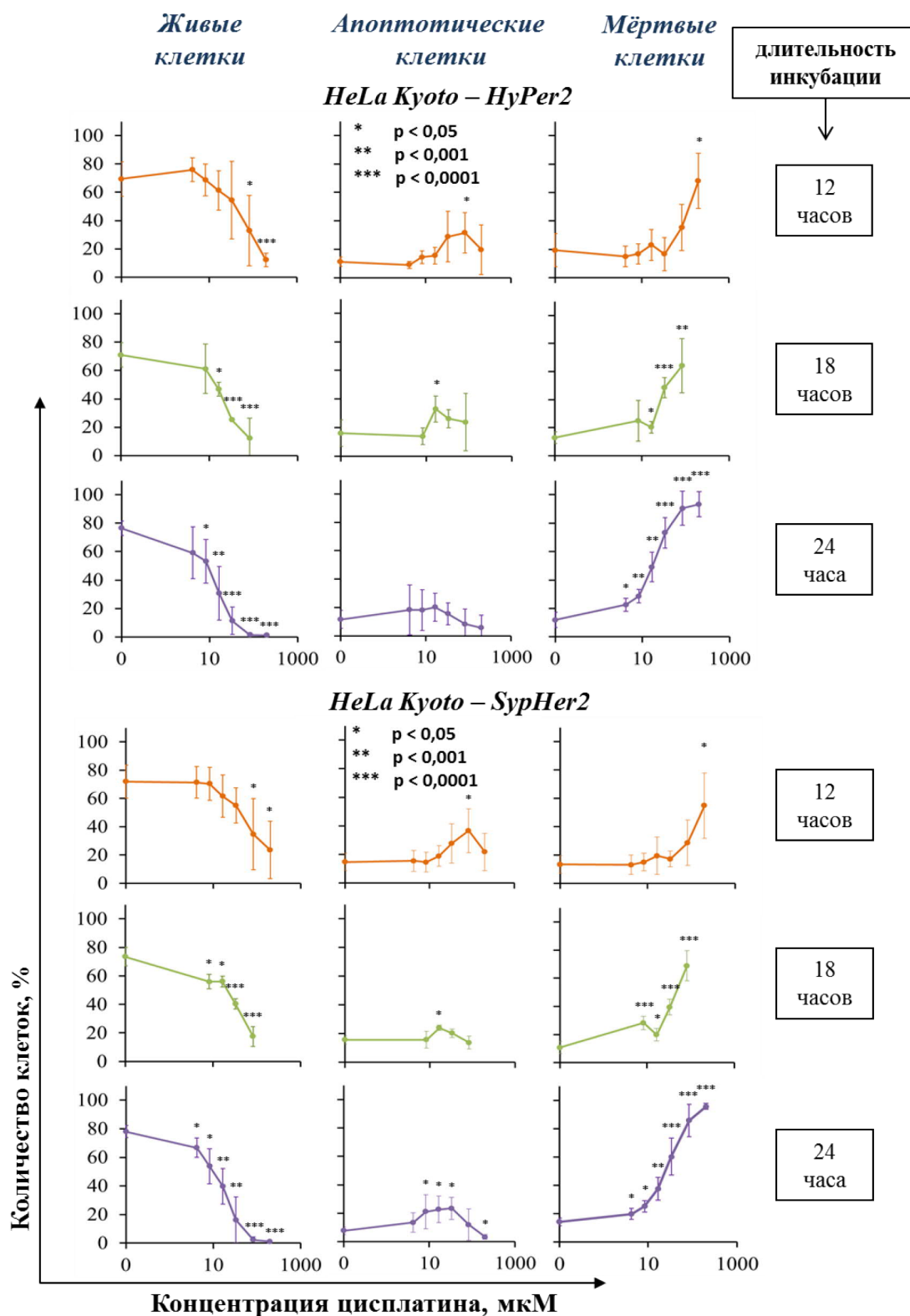


Рисунок 4. Процент жизнеспособных, апоптотических и мертвых клеток HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2 при воздействии возрастающих концентраций цисплатина в течение 12, 18 или 24 часов. Графики представлены в виде средних значений $\pm$ CO. При длительности 12 часов было проведено по 5 экспериментов для каждой клеточной линии, при инкубации 18 часов – по 3 эксперимента, при экспозиции с препаратом в течение 24 часов – 6 экспериментов для HeLa Kyoto-HyPer2 и 5 экспериментов для HeLa Kyoto-SypHer2. Звездочками отмечены статистически значимые различия между значениями для обработанных и необработанных цисплатином клеток (критерий Стьюдента для независимых выборок)

Влияние цисплатина на цитоплазматический уровень H_2O_2 и pH. При анализе отклика сенсоров интенсивность флуоресценции контрольных клеток (клетки без воздействия цисплатином) была принята за 100%. Инкубация с цисплатином в течение 12 часов приводила к росту интенсивности флуоресценции HyPer2 и уменьшению флуоресценции SypHer2 в живых клетках при 83,0 мкМ и 200,0 мкМ (рисунок 5, верхний ряд). В апоптотических клетках лишь концентрация в 83,0 мкМ у сенсора HyPer2 вызывала существенное увеличение интенсивности флуоресценции. Через 18 часов инкубации (рисунок 5, средний ряд) в живых клетках интенсивность флуоресценции HyPer2 возрастала при концентрациях цисплатина 16,6 мкМ, 33,2 мкМ и 83,0 мкМ, в апоптотических клетках рост флуоресценции был более выраженным и начинался уже при 8,3 мкМ препарата (IC_{50}). При этом для клеток, проходящих стадию апоптоза, значения превышают таковые для живых клеток. Интенсивность флуоресценции сенсора SypHer2 показала отсутствие значительных изменений в уровне pH. Следовательно, реакция сенсора HyPer2 при данной длительности воздействия препаратом была обусловлена только увеличением внутриклеточного уровня H_2O_2 .

При инкубации с цисплатином в течение 24 часов (рисунок 5, нижний ряд) количество живых клеток при высоких концентрациях препарата было недостаточным для анализа изменений реакции сенсоров в них. Интенсивность флуоресценции HyPer2 увеличивалась при воздействии 16,6 мкМ и 33,2 мкМ цисплатина как в живых, так и в апоптотических клетках. Интенсивность флуоресценции SypHer2 была увеличена в сравнении с контролем в апоптотических клетках при инкубации с низкими концентрациями препарата 4,2 мкМ и 8,3 мкМ, что свидетельствовало о защелачивании внутриклеточной среды. Повышение интенсивности флуоресценции сенсора HyPer2 после 24 часов инкубации с 16,6 мкМ и 33,2 мкМ цисплатина, таким образом, было обусловлено увеличением концентрации H_2O_2 в опухолевых клетках, а не сдвигом pH. Также следует отметить, что, учитывая изменения интенсивности флуоресценции сенсора SypHer2, при действии 4,2 мкМ и 8,3 мкМ цисплатина, количество H_2O_2 могло быть определено как сниженное в сравнении с контрольными интактными клетками.

Полученные данные согласуются с исследованиями других авторов, показывающих, что цисплатин способен вызывать повышенное образование АФК и окислительный стресс (*Santos, Catao et al., 2007; Marullo, Werner et al., 2013; Yin, Sun et al., 2017*). Показано, что в клетках млекопитающих митохондриальная продукция АФК усиливает цитотоксический эффект цисплатина, вызванный повреждением ядерной ДНК (*Marullo, Werner et al., 2013*). Существуют работы, указывающие, что H_2O_2 может являться участником клеточной реакции на воздействие противоопухолевыми агентами, включая цисплатин, а также способствовать развитию апоптоза (*Ahmad, Iskandar et al., 2004; Mizutani, Tada-Oikawa et al., 2005; Wang, Chanvorachote et al., 2007; Wan, Xiang et al., 2016*).

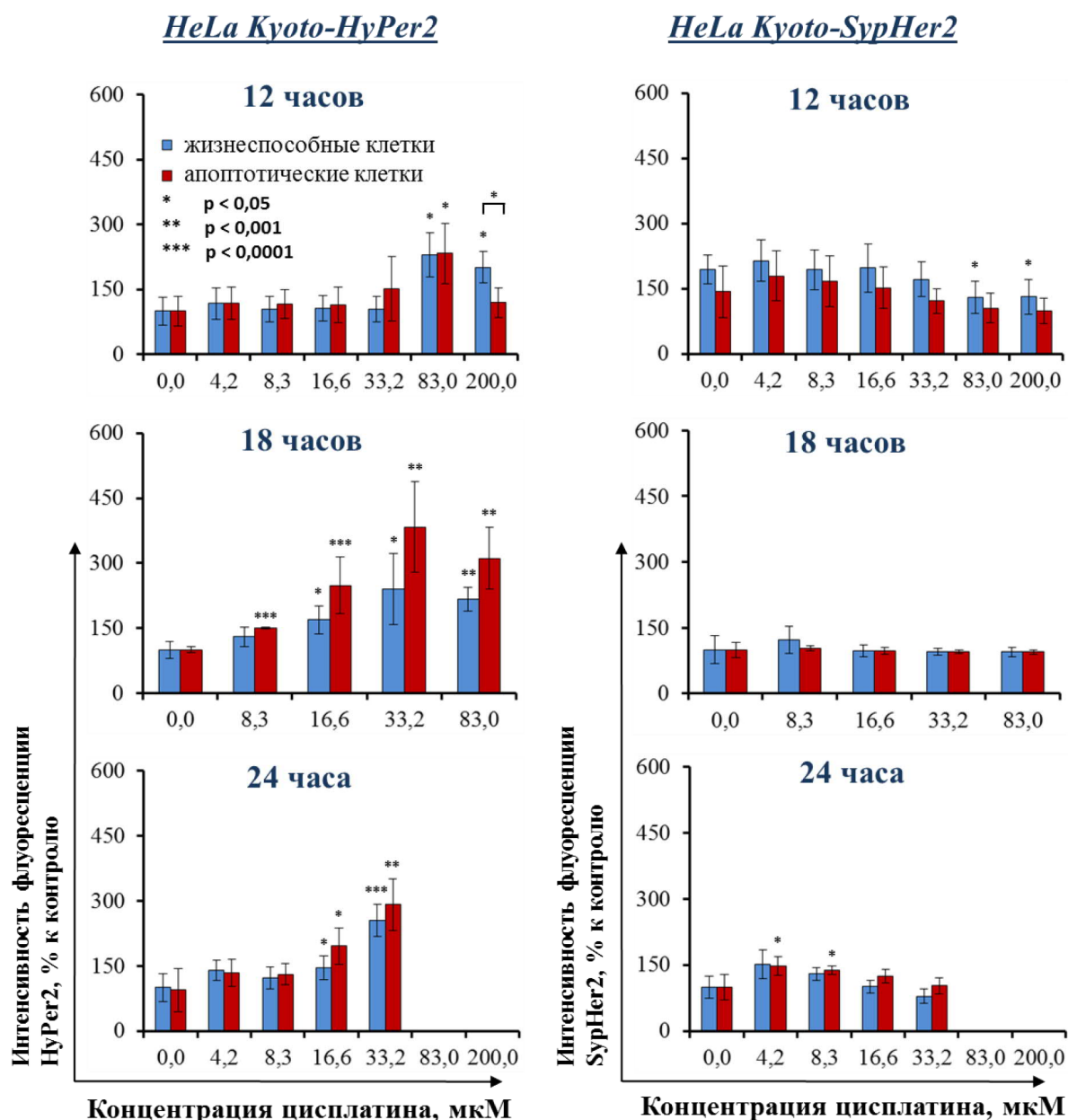


Рисунок 5. Изменение интенсивности флуоресценции HyPer2 (уровень H_2O_2 и pH) и SypHer2 (уровень pH) при действии возрастающих концентраций цисплатина. Графики представлены в виде средних значений $\pm$ CO. При длительности 12 часов было проведено по 5 экспериментов для каждой клеточной линии, при инкубации 18 часов – по 3 эксперимента, при экспозиции с препаратом в течение 24 часов - 6 экспериментов для HeLa Kyoto-HyPer2 и 5 экспериментов для HeLa Kyoto-SypHer2. Звездочками отмечены статистически значимые различия между значениями для обработанных и необработанных цисплатином клеток (критерий Стьюдента для независимых выборок)

Практически все клетки, погибающие при воздействии цисплатина в нашем исследовании, претерпевали экстернализацию фосфатидилсерина, что исключало некротический механизм гибели. Считается, что выбор клеткой апоптотического или некротического механизма определяется концентрацией и длительностью воздействия цисплатина. При больших концентрациях и коротких временах воздействия клетка склонна погибать по некротическому

механизму, в то время как более низкие концентрации вызывают преимущественно активацию апоптотического механизма (Baek, Kwon et al., 2003; Sancho-Martínez, Piedrafita et al., 2011).

Таким образом, для последующих экспериментов была выбрана концентрация цисплатина 16,6 мкМ и длительность инкубации с препаратом 18 часов.

Определение уровня H_2O_2 в условиях использования ловушек АФК

Определение апоптоза по экстернализация фосфатидилсерина. При 18-часовой инкубации добавление NAC в культуральную среду с цисплатином привело к увеличению количества жизнеспособных клеток HeLa Kyoto-HyPer2 по сравнению с их количеством при инкубации только с цисплатином, количество апоптотических клеток при этом уменьшается с $33 \pm 9\%$ до $17 \pm 8\%$ (рисунок 6А).

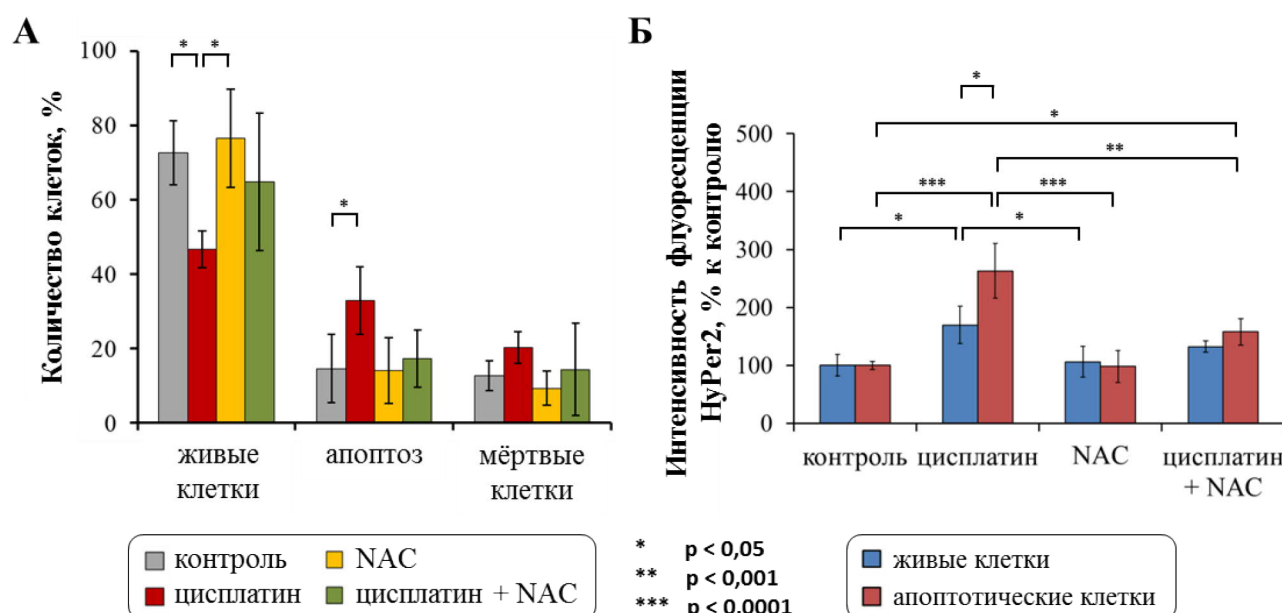


Рисунок 6. Процент жизнеспособных, апоптотических и мертвых клеток HeLa Kyoto-HyPer2 относительно степени их окрашивания ФЭ Аннексином V и 7-AAD (А) и изменение флуоресценции сенсора HyPer2 (Б) при воздействии /без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC. Графики представлены в виде средних значений трех экспериментов $\pm$ CO. Звездочками отмечены статистически значимые различия между значениями для обработанных и необработанных цисплатином клеток (однофакторный дисперсионный post-hoc анализ с критерием Бонферрони)

Добавление NAC в инкубационную среду с цисплатином приводило к значительному снижению интенсивности флуоресценции сенсора HyPer2 как в популяции жизнеспособных (с $170 \pm 32\%$ до $132 \pm 10\%$), так и в популяции апоптотических клеток ($263 \pm 47\%$ до $158 \pm 22\%$) (рисунок 6Б). Способность NAC предотвращать вызванный цисплатином апоптоз была продемонстрирована ранее. В работе (Wang, Martindale et al., 2000) обнаружено, что добавленный с 30 мкМ цисплатина 1мМ NAC способен предотвратить развитие апоптоза клеток HeLa при инкубации в течение 24 часов посредством ингибирования активации ERK и

расщепления PARP, индуцированных цисплатином. Возможность NAC повышать выживаемость клеток через активацию ERK и предотвращать апоптоз была также показана другими авторами (*Wung, Cheng et al., 1999; Li, Dehnade et al., 2000*). NAC также способен ингибировать активацию c-Jun N-концевой киназы, p38 MAP-киназы, редокс-чувствительного активирующего белка-1, подавлять активность ядерного фактора транскрипции каппа В, а также предотвращать апоптоз и способствовать выживанию клеток путем активации внеклеточного сигнал-регулирующего киназного пути (*Zafarullah, Li et al., 2003*).

NAC ингибирует цисплатин-индуцированную экспрессию p53 и p21 в клетках мелкоклеточной карциномы легких LX-1, токсичность цисплатина была подавлена NAC в SKOV3 как p53-зависимым, так и p53-независимыми механизмами (*Wu, Muldoon et al., 2005*). Таким образом, NAC способен блокировать цисплатин-индуцированный апоптоз посредством ингибирования как митохондриального, так и рецепторозависимого механизмов. Наши результаты демонстрируют, что увеличение жизнеспособности клеточных линий при добавлении ловушки АФК в инкубационную среду с цисплатином происходит одновременно со снижением флуоресценции чувствительного к изменениям уровня H_2O_2 сенсора HyPer2, что свидетельствует об участии H_2O_2 в индуцируемом цисплатином апоптозе.

Определение апоптоза по изменению мембранного потенциала митохондрий. Добавление NAC в инкубационную среду с цисплатином приводило к существенному увеличению процента жизнеспособных клеток HeLa Kyoto-HyPer2 в сравнении с клетками, обработанными только цисплатином. Одновременно с этим процент апоптотических клеток HeLa Kyoto-HyPer2 значительно снижался: с $43 \pm 12\%$ до $15 \pm 4\%$ (рисунок 7А).

Одновременное инкубирование клеток HeLa Kyoto-HyPer2 с цисплатином и NAC приводило к снижению интенсивности флуоресценции сенсора HyPer2 в апоптотических клетках в сравнении с клетками, подвергнутыми действию только цисплатином в течение 18 часов: с $263 \pm 69\%$ до $137 \pm 33\%$ (рисунок 7Б). Таким образом, устранение H_2O_2 с использованием NAC может быть причиной предотвращения падения мембранного потенциала митохондрий и развития апоптотической реакции при действии цисплатина.

В отличие от случая выделения апоптотических клеток при окрашивании ФЭ Аннексином V, при выделении клеток на основе окрашивания TMRE, увеличение интенсивности флуоресценции сенсора H_2O_2 при инкубации с цисплатином наблюдалось исключительно у апоптотических, но не жизнеспособных клеток. Следует отметить, что при развитии апоптоза изменение $\Delta\Psi_m$, определяемое окрашиванием TMRE, происходит раньше, чем экстернализация ФС, определяемая Аннексином V. Поэтому при окрашивании TMRE клетки с нарушенным мембранным потенциалом, но еще не успевшие экстернализовать ФС, попадают в популяцию апоптотических.

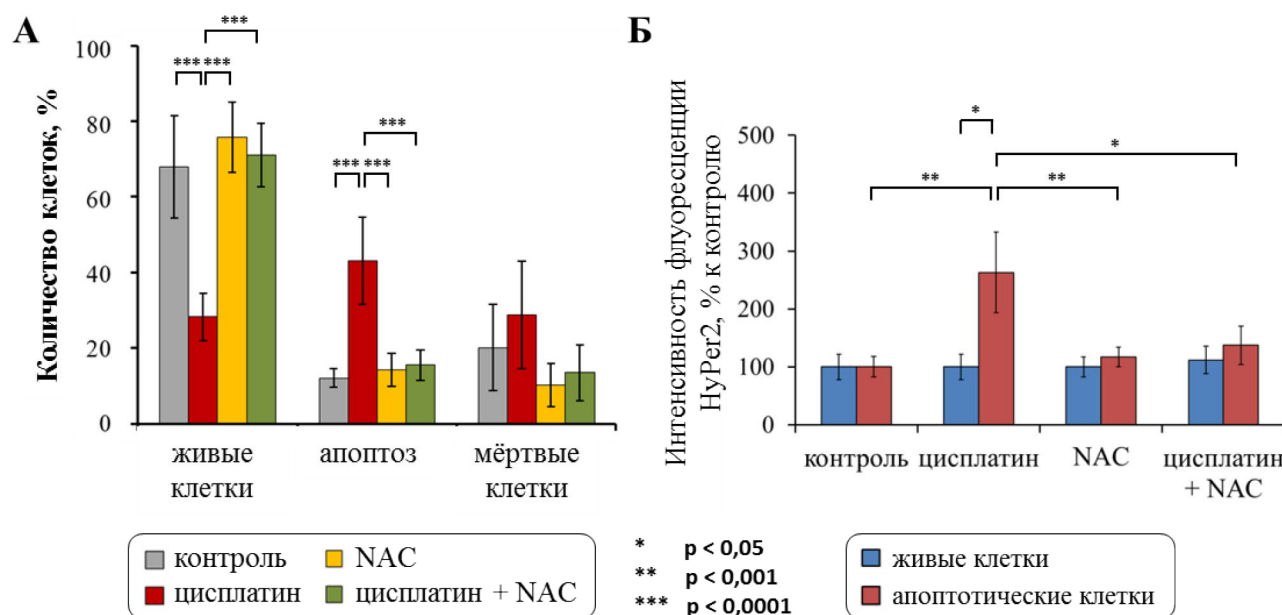


Рисунок 7. Процент жизнеспособных, апоптотических и мертвых клеток HeLa Kyoto-HyPer2 относительно степени их окрашивания TMRE и 7-AAD (А) и изменение флуоресценции сенсора HyPer2 (Б) при воздействии /без воздействия 16,6 мкМ цисплатина и 5,0 мМ NAC. Графики представлены в виде средних значений шести экспериментов $\pm$ СО. Звездочками отмечены статистически значимые различия между значениями для обработанных и необработанных цисплатином клеток (однофакторный дисперсионный post-hoc анализ с критерием Бонферрони)

Эти же клетки при окрашивании на основе Аннексина V идентифицировались бы как относящиеся к популяции жизнеспособных клеток. Если же клетки успевали за время инкубации с препаратом и потерять $\Delta\Psi_m$ и экстернализовать ФС, то они в обоих вариантах окрашивания были идентифицированы как апоптотические. Даже незначительное снижение $\Delta\Psi_m$ может привести к существенному увеличению производства АФК, способных нанести ущерб клетке (Korshunov, Skulachev et al., 1997). В клетке, подвергшейся индуцированному TNF- α апоптозу, наблюдается частичное снижение $\Delta\Psi_m$, сопровождаемое высоким уровнем АФК (Gottlieb, Vander Heiden et al., 2000). Цисплатин способствует увеличению TNF- α , снижению содержания GSP и СОД, вакуолизации митохондрий, оказывает нейротоксичное действие на периферические нервы крыс, а введение NAC уменьшает данные эффекты (Zaki, Mohamed et al., 2018). Показано, что цисплатин вызывает окислительный стресс в митохондриях и снижает $\Delta\Psi_m$ (Saad, Najjar et al., 2004). H_2O_2 может являться основным окислительным компонентом, ответственным за подавление Bcl-2, возникающим одновременно с другими АФК при воздействии цисплатина (Wang, Chanvorachote et al., 2008).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе разработана новая методика оценки уровня H_2O_2 в популяциях жизнеспособных и апоптотических клеток независимо друг от друга. Возможность использования данной методики для оценки внутриклеточных изменений уровня H_2O_2 при контроле изменений pH внутри клетки продемонстрирована на примере действия противоопухолевого препарата Цисплатин.

Проведено исследование влияния генетически-кодируемых сенсоров HyPer2 или SypHer2 на жизнеспособность клеточной линии HeLa Kyoto. Показано, что увеличение концентраций цисплатина вызывает схожее дозо- и время-зависимое влияние на жизнеспособность как в культуре с генетически кодируемыми сенсорами, так и в культуре без сенсоров.

Проведена оценка содержания H_2O_2 в жизнеспособных и апоптотических клетках HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa Kyoto-SypHer2. С использованием флуоресцентных красителей, маркирующих процессы апоптоза на разных стадиях его развития, показано, что цисплатин-индуцированное накопление H_2O_2 происходит на фоне потери мембранного потенциала митохондрий и начинается раньше экстернализации фосфатидилсерина. Продemonстрировано, что добавление ловушек АФК способствует сохранению мембранного потенциала митохондрий и ингибирует экстернализацию фосфатидилсерина. Показано, что ловушки АФК при одновременном использовании с цисплатином предотвращают вызванную им клеточную гибель опухолевых клеток и сохраняют концентрацию H_2O_2 на уровне, близком к контрольному.

ВЫВОДЫ

1. Модификация клеток HeLa Kyoto сенсорами HyPer2 и SypHer2 не оказывает существенного влияния на их чувствительность к цисплатину.
2. Низкие концентрации цисплатина в большей степени вызывают цитостатический эффект, высокие концентрации препарата обладают цитотоксическим действием.
3. Цисплатин вызывает дозо-зависимое увеличение уровня H_2O_2 в клетках HeLa Kyoto. Наибольший подъем уровня H_2O_2 выявлен при инкубации в течение 18 часов при концентрации $2 \times IC_{50}$ (16,6 мкМ). Динамика изменений уровня пероксида водорода различается в живых и апоптотических клетках, наиболее выраженный подъем выявлен у клеток, претерпевающих апоптоз.
4. Уровень пероксида водорода зависит от стадии клеточной гибели. Сопоставление динамики уровня H_2O_2 опухолевых клеток с маркерами разных стадий апоптоза показало, что рост его концентрации наблюдается одновременно с потерей мембранного потенциала

митохондриями и предшествует выходу фосфатидилсерина на внешнюю поверхность плазматической мембраны.

5. Добавление ловушек АФК ингибирует цисплатин-индуцированный апоптоз опухолевых клеток и препятствует повышению концентрации H_2O_2 как в живых клетках, так и в клетках, находящихся в апоптозе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК

1. **Nerush A.S.**, Shchukina K.M., Balalaeva I.V., Orlova A.G. Hydrogen peroxide in the reactions of cancer cells to cisplatin // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. – 2019. – V. 1863. – P. 6902-702.
2. **Неруш А.С.**, Щукина К.М., Орлова А.Г. протекторная роль N,N'-диметилтиомочевина и ее влияние на внутриклеточный уровень пероксида водорода при воздействии цисплатина на клетки HeLa Kyoto // *Современные технологии в медицине*. – 2018. – Т. 10, № 3. – С. 78-87.
3. **Белова (Неруш) А.С.**, Орлова А.Г., Брилкина А.А., Масленникова А.В. Чувствительность клеток линии Hela Kyoto, трансфицированных сенсором HyPer2, к действию цисплатина // *Современные технологии в медицине*. – 2014. Т. 6, № 4. – С.7-13.
4. **Белова (Неруш) 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 Kyoto с использованием генетически-кодируемых сенсоров. *Современные технологии в медицине*. – 2013. – Т. 5, №4. – С. 19-24.

Патент на изобретение

Белова (Неруш) А.С., Орлова А.Г., Белоусов В.В., Брилкина А.А., Загайнова Е.В, Масленникова А.А. Способ оценки содержания пероксида водорода в опухолевых клетках при воздействии на них противоопухолевого препарата. Патент № 2497121 С1.

Публикации в других изданиях, тезисы докладов

1. **Nerush A.S.**, Shchukina K.M., Balalaeva I.V., Orlova A. G. Hydrogen peroxide level in tumor cells during cisplatin-induced apoptosis // *Proceedings of SPIE: Biomedical optics. Medical Laser Applications and Laser-Tissue Interactions IX*. (Munich, Germany, 2019) – 2019. – V. 11079. – P.110791M.
2. Щукина К.М., **Неруш А.С.**, Орлова А.Г. Изменение уровня АФК в клетках HeLa Kyoto на разных стадиях цисплатин-индуцированной клеточной гибели // *Актуальные вопросы биологической физики*. – 2018. – 3(4). – С.699-705.
3. **Belova (Nerush) A.S.**, Orlova A.G., Shchukina K.M., Balalaeva I.V., Antonova N.O, Zagaynova E.V. Cisplatin-induced hydrogen peroxide level changes as compared to total ROS level changes // *Proceedings of International Symposium «Topical problems of biophotonics – 2017»* (St.-Petersburg – Nizhny Novgorod, Russia, 27-31 July 2017). – 2017. – P.74.
4. **Nerush A.**, Orlova A., Shchukina K., Balalaeva I., Antonova N., Zagaynova E. Fluorescence sensing of hydrogen peroxide and total ROS level changes under cisplatin treatment of tumor cells // *Book of abstracts of Congress of the European Society for Photobiology* (Pisa, Italy, 4-8 September 2017). – P.111-112.
5. **Belova (Nerush) 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). –P. 113-121.

6. **Belova (Nerush) A.S.**, Orlova A.G., Balalaeva I.V., Antonova N.O., Mishina N.M., Zagaynova E.V. Fluorescence sensing of hydrogen peroxide level changes under cisplatin treatment of tumor cells // Book of Conference Programm with abstracts of «Conference on advanced fluorescence imaging methods» (Dagomys, Sochi, Russia, 3-6 October 2016). – 2016 – P.9.

7. Orlova A.G., **Belova (Nerush) A.S.**, Balalaeva I.V., Antonova N.O., Maslennikova A.V., Zagaynova E.V., and Belousov V.V. Hydrogen Peroxide Level Changes in Viable and Apoptotic Tumor Cells under Cisplatin Action. Conference Papers of «Biomedical Optics 2016»: Technical Digest. OSA. (online) (Fort Lauderdale, Florida, United States, 25–28 April 2016). – 2016. – JM3A.44.

8. **Belova (Nerush) A.S.**, Orlova A.G., Balalaeva I.V., Razumkova N.N., Maslennikova A.V., Mishina N.M., Shakhova N.M., Zagaynova E.V., Belousov V.V. Effects of cisplatin on the level of hydrogen peroxide and cell death in HeLa Kyoto cells // Book of Abstracts of Saratov fall meeting 2015: third international symposium on optics and biophotonics and seventh finnish-russian photonics and laser symposium (Saratov, 21-25 сентября 2015). – 2015. – P.43-44.

9. **Belova (Nerush) A.S.**, Orlova A.G., Balalaeva I.V., Razumkova N.N., Maslennikova A.V., Mishina N.M., Shakhova N.M., Zagaynova E.V., Belousov V.V. Hydrogen peroxide in cisplatin-induced reaction of tumor cells // Proceedings of V International Symposium Topical Problems of Biophotonics 2015. V Международном симпозиуме «Topical problems of biophotonics – 2015» (Нижний Новгород – Елабуга – Нижний Новгород, 20-24 July 2015). – 2015. – P.264-265.

10. **Белова (Неруш) А.С.**, Орлова А.Г., Балалаева И.В., Антонова Н.О., Брилкина А.А., Масленникова А.В., Шахова Н.М., Мишина Н.М. Уровень пероксида водорода, pH, апоптоз и некроз в клетках HeLa Kyoto-HyPer2 и HeLa KyotoHyPer2 C199S, вызванные цисплатином // Материалы съезда. VII Съезд Российского фотобиологического общества (пос. Шепси, 14-20 сентября 2014). – 2014. – С. 98.

11. **Belova (Nerush) 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: Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications VI. (San Francisco, California, United States, 1-6 February 2014). – Vol. 8956. – P. 895612.

12. **Белова (Неруш) А.С.**, Сергеева Е.А., Брилкина А.А., Мишина Н.М., Масленникова А.В., Орлова А.Г., Загайнова Е.В., Шахова Н.М., Белоусов В.В. Использование генетически кодируемого сенсора HyPer для изучения уровня пероксида водорода при воздействии цисплатина // Сборник тезисов «Форум молодых ученых 2013» (Нижний Новгород, 16-18 сентября 2013). – 2013. – С.15-16.

13. **Белова (Неруш) А.С.**, А.Г. Орлова, И.В. Балалаева, Н.О. Антонова, А.А. Брилкина, А.В. Масленникова, Н.М. Шахова, Н.М. Мишина. Флуоресцентный сенсор пероксида водорода HyPer для исследования ответа клеток HeLa Kyoto на воздействие цисплатина // Сборник трудов конференции: VI Троицкая конференция «Медицинская физика и инновации в медицине» (Троицк, Москва, 2-6 июня 2013). – 2013. – С.315-317.

14. **Belova (Nerush) A.S.**, Sergeeva E.A., Brilkina A.A., Mishina N.M., Orlova A.G., Maslennikova A.V., Zagaynova E.V., Shakhova N.M., Belousov V.V., Lukyanov S.A. Use of genetically encoded sensor hyper for studying hydrogen peroxide implication in the mechanism of cisplatin action // Proceedings of the IV International Symposium «Topical Problems of Biophotonics – 2013» (Нижний Новгород – Ярославль – Казань – Нижний Новгород, 21-27 July 2013). – 2013. – С.127-128.

15. **Белова (Неруш) А.С.**, Сергеева Е.А., Брилкина А.А., Мишина Н.М., Масленникова А.В., Орлова А.Г., Загайнова Е.В., Шахова Н.М., Белоусов В.В., Лукьянов С.А. Использование генетически кодируемого сенсора HyPer для изучения механизма действия цисплатина // Материалы V с международным участием медико-биологического конгресса молодых ученых (Тверь, 3-8 декабря 2012) – 2012. – С. 211-212.

16. **Белова (Неруш) А.С.**, Сергеева Е.А., Брилкина А.А., Мишина Н.М., Масленникова А.В., Орлова А.Г., Загайнова Е.В., Шахова Н.М., Белоусов В.В., Лукьянов С.А. Исследование уровня пероксида водорода в цитоплазме опухолевых клеток под воздействием

цисплатина с использованием сенсора NuPer // Материалы докладов IV Съезда биофизиков России, 2012 (Нижний Новгород, 20-26 августа 2012). – 2012. – С.30.

17. **Белова (Неруш) А.С.**, Сергеева Е.А., Брилкина А.А., Мишина Н.М., Масленникова А.В., Орлова А.Г., Загайнова Е.В., Шахова Н.М., Белоусов В.В., Лукьянов С.А. Международной конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика '12"» (Пущино, 22-24 октября 2012). – 2012. – С.11-12.