

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ АФК В КЛЕТКАХ HELA KYOTO НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЦИСПЛАТИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

Щукина К.М.¹, Неруш А.С.², Орлова А.Г.²

¹ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603950, РФ

² ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики РАН»

ул. Ульянова, 46, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: ksushaschukina1995@yandex.ru

Поступила в редакцию: 14.07.2018.

Аннотация. Цисплатин – химиотерапевтический препарат, успешно применяемый в лечении широкого спектра опухолей. Данный препарат может вызвать митохондриальную дисфункцию и повышенное производство активных форм кислорода (АФК), что приводит к повреждению мембраны, ДНК и других важных элементов клетки. Целью работы было исследование изменений уровня АФК на разных стадиях клеточной гибели, вызванной цисплатином. В работе использовалась линия HeLa Kyoto, флуоресцентный краситель DCFH-DA, маркер апоптоза ФЭ-Аннексин V и витальный краситель 7-актиноаминомицин D. С использованием метода проточной цитофлуориметрии было показано, что большинство жизнеспособных клеток после обработки препаратом интенсивно окрашиваются DCFH-DA, что свидетельствует об активно идущих в них окислительных процессах и высоком уровне АФК. На стадии раннего апоптоза количество АФК уменьшается по сравнению с необработанным препаратом клетками.

Ключевые слова: цисплатин, активные формы кислорода, апоптоз.

ВВЕДЕНИЕ

Активные формы кислорода (АФК) составляют отдельную систему в организме, участвующую как в ряде физиологических функций, так и во многих патологических процессах. К настоящему времени показано, что клетки злокачественных новообразований, по сравнению с нормальными клетками, характеризуются повышенным уровнем АФК и нарушением окислительно-восстановительного баланса, играющим одну из ключевых ролей в развитии рака. Постоянное про-окислительное состояние и внутренний окислительный стресс является одной из основных особенностей опухолевых клеток [1, 2]. Усиленная продукция АФК характерна для большинства злокачественных клеток. В опухолях АФК являются важными регуляторами роста, пролиферативной активности, дифференцировки, подвижности клеток, метастазирования, ангиогенеза [3].

Нормальные клетки при физиологических условиях поддерживают постоянный уровень АФК благодаря постоянному контролю их продукции и деградации, а при вызванном различными воздействиями повышении уровня АФК активируют систему антиоксидантной защиты, не позволяющую уровню АФК достичь порогового уровня. В раковых клетках увеличение генерации АФК может вызвать окислительно-восстановительной адаптацию, усиление антиоксидантной способности и поддержание уровня АФК ниже токсического порога. Дальнейшее увеличение уровня АФК, выше порогового уровня, способно вызвать гибель клеток. Это может стать биохимической основой для разработки терапевтических подходов, направленных на избирательное воздействие на раковые клетки [4].

Существуют данные, что АФК принимают участие в реализации механизма противоопухолевого действия химиотерапевтических препаратов. Многие агенты, используемые для химиотерапии рака, вызывают окислительный стресс, который лежит в основе повреждения клеток. Окислительный стресс уменьшает скорость пролиферации, вызывает задержку клеточного цикла и может способствовать развитию клеточной гибели по пути апоптоза [5].

Цисплатин – эффективный химиотерапевтический препарат, который успешно применяется в лечении широкого спектра опухолей. Хотя основной мишенью при воздействии цисплатина на опухолевую клетку является ДНК – он вызывает внутри- и межнитевые сшивки цепей с образованием аддуктов ДНК – он так же способен приводить к образованию АФК [6, 7]. Такие особенности цисплатина делают его наиболее интересным в плане изучения возможной роли АФК в механизме клеточной гибели и разработки более эффективных и менее токсичных препаратов.

Повышение уровня АФК в процессе индуцированной цисплатином гибели продемонстрировано для ряда нормальных и опухолевых клеточных линий [8-10]. Анализ участия АФК в реализации самых ранних стадий апоптоза проведен в работе [11].

Целью нашей работы было исследование изменений уровня АФК на разных стадиях клеточной гибели, вызванной цисплатином. Уровень АФК определяли с использованием зонда 2',7'-дихлорфлуоресцин диацетата (DCFH-DA), который при попадании в клетку окисляется АФК (O_2^- , $\cdot OH$, H_2O_2 , 1O_2 , NO) с образованием флуоресцирующего соединения DCF [12]. Кроме того, клетки маркировали специфичными красителями на апоптоз и общую клеточную гибель. С помощью проточной цитофлуориметрии для каждой клетки одновременно определяли интенсивность окрашивания всеми тремя маркерами. Такой подход позволяет выделить популяции

жизнеспособных клеток и клеток, проходящих стадию раннего и позднего апоптоз/некроза, и в каждой из популяций отдельно определить уровень АФК. Такой подход уже был использован нами при анализе цисплатин-индуцированных изменений уровня пероксида водорода с использованием флуоресцентного генетически-кодируемого сенсора [13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная линия и обработка цисплатином.

В работе использована клеточная линия HeLa Kyoto – аденокарцинома шейки матки человека. Клетки культивировались в среде DMEM (от англ. Dulbecco's Modified Eagle Medium) («ПанЭко», Россия), содержащей 2 ммоль/л глутамина и 10 % FBS (HyClone, США) в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч (37,0 °C, 5 % CO₂). За сутки до эксперимента клетки высаживались в 12-луночный планшет в количестве 1×10⁵ клеток на 1 лунку, затем производилась замена питательной среды на среду, содержащую 5 мг/мл или 10 мг/мл цисплатина, в контрольной лунке – на свежую среду без цисплатина. Длительность инкубации с препаратом составляла 24 часа. Далее клетки анализировались 2 разными методами.

Окрашивание трипановым синим.

Для оценки цитотоксического действия цисплатина на клетки использовался метод окрашивания трипановым синим [14]. Трипановый синий представляет собой кислый анилиновый краситель, используемый для селективного окрашивания поврежденных клеток. Он проникает через поврежденную мембрану и окрашивает ядро клетки, окрашенные таким способом клетки принято считать мертвыми. После экспозиции с препаратом среда из лунок с плавающими в ней клетками переносилась в пробирки, оставшиеся на подложке клетки заливали 750 мкл раствора трипсин–Версен (1:1) и перемещали в CO₂-инкубатор на 5 мин, затем содержимое лунок переносилось в соответствующую пробирки. Клетки осаждали центрифугированием в течении 5 минут (900 об/мин, Eppendorf, Германия). После удаления надосадочной жидкости клетки окрашивали 0,2 % раствором трипанового синего (растворенным в натрий-фосфатном буфере – PBS). Подсчет живых неокрашенных клеток и окрашенных клеток проводили с использованием камеры Горяева.

Проточная цитофлуориметрия.

Для анализа разных стадий клеточной гибели была использована методика проточной цитофлуориметрии с использованием набора на апоптоз Annexin V-PE apoptosis detection kit I (BD Biosciences, США) [13]. Параллельно при помощи красителя DCFH-DA оценивался уровень АФК внутри каждой клетки. В состав набора Annexin V-PE apoptosis detection kit I входит 2 красителя: ФЭ-Аннексин V и 7-актиноаминомицин D (7-AAD). ФЭ-Аннексин V представляет собой конъюгат из аннексина и фикоэритрина. Аннексин имеет естественное сродство к фосфатидилсерину, который транслоцируется с внутренней поверхности плазматической мембраны на внешнюю вскоре после начала апоптоза у большинства клеток. Фикоэритрин – красный фотосинтетический пигмент, присоединенный к аннексину и позволяющий таким образом выявить клетки, переживающие апоптоз. 7-AAD (витальный краситель) способен проникать сквозь поврежденную клеточную мембрану и встраиваться между цитозиновым и гуаниновым основаниями ДНК, но не РНК. Окрашивание клеток данными красителями позволило проанализировать распределение клеток по стадиям клеточной гибели при воздействии разных концентраций препарата: жизнеспособные клетки плохо окрашивались и ФЭ-Аннексином V, и 7-AAD, клетки в стадии раннего апоптоза хорошо окрашивались ФЭ-Аннексином V, но были слабо окрашены 7-AAD, мертвые клетки (в стадии позднего апоптоза или некротические клетки) были интенсивно окрашены обоими красителями.

DCFH-DA часто используется для определения общего уровня АФК в клеточных линиях. При добавлении к исследуемым клеткам DCFH-DA проникает через клеточные мембраны, деацетируется клеточными эстеразами в нефлуоресцентное соединение 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин (DCFH), несущее отрицательный заряд, что затрудняет обратный выход красителя из клетки. DCFH накапливается в клетке и при последующем окислении различными АФК превращается во флуоресцирующий дихлорфлуоресцеин (DCF). Таким образом, DCF может быть обнаружен методами проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии [15, 16]. Таким образом, использование DCFH непосредственно с маркерами на апоптоз позволило судить об уровне АФК на всех стадиях клеточной гибели.

После экспозиции с препаратом среда из лунок с плавающими в ней клетками переносилась в пробирки, оставшиеся на подложке клетки аккуратно снимались и промывались холодным PBS дважды. Собранные таким способом клетки центрифугировали (Eppendorf, Германия) в течении 5 минут при 900 об/мин, снимали надосадочную жидкость, после чего в каждую пробирку заливали по 1 мл 8 мкМ DCFH-DA («ПанЭко», Россия). Экспозиция с красителем производилась в темноте в течении 30 минут. По завершении окрашивания клетки были посчитаны на камере Горяева, после чего снова процетрифугированы в течении 5 минут при 900 об/мин. После снятия надосадочной жидкости клетки были залиты аннексин-связывающим буфером в количестве 1,5×10⁶ клеток/мл. По 1,5×10⁵ клеток было перемещено в пробирки для проточной цитофлуориметрии, к каждой из проб было добавлено по 5 мкл ФЭ-Аннексина V, и 7-AAD. Экспозиция с данными красителями проводили в течении 15 минут в темноте при комнатной температуре, после чего клетки помещали в холод и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) в течении часа. Непосредственно перед анализом в каждую пробирку добавляли по 400 мкл аннексин-связывающего буфера. Регистрацию изменений флуоресценции красителей осуществляли с использованием трех фильтров: 530/30 нм для DCFH-DA (канал FL1), 585/42 нм для ФЭ Аннексина V (канал FL2) и 670 LP для 7-AAD (канал FL3), возбуждение осуществлялось

лазером на длине волны 488 нм. Для анализа данных, полученных методом проточной цитофлуориметрии, использовалась программа BD CellQuest™ Pro Software (Becton Dickinson, USA).

Статистическая обработка данных.

Статистическая обработка данных проведена с использованием программ Excel 2016 (Microsoft, США) и Statistica 6.0 (StatSoft, США). Данные по окрашиванию трипановым синим представлены в виде средних значений по семи независимым экспериментам, каждый в 2 биохимических повторностях и ошибок средних. Для определения статистической значимости различий между группами использовался однофакторный дисперсионный анализ с post-hoc критерием Бонферрони для множественных сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты окрашивания клеток HeLa Kyoto трипановым синим показали двукратное снижение процента жизнеспособных клеток при инкубации с 5 мкг/мл цисплатина в течение 24-х часов (с $91 \pm 3\%$ до $42 \pm 1\%$), увеличение концентрации цисплатина в 2 раза привело к уменьшению выживаемости клеток почти в 4 раза (до $23 \pm 3\%$) в сравнении с контрольными клетками (рис. 1).

Полученное методом проточной цитофлуориметрии распределение клеток по интенсивностям флуоресценции ФЭ-Аннексина V и 7-AAD показало, что добавление цисплатина в концентрации 5 мкг/мл приводило к «миграции» клеток из популяции слабоокрашенной по обоим маркерам (жизнеспособных, рис. 2а, нижний левый квадрант) клеток в популяцию с высокой интенсивностью флуоресценции ФЭ-Аннексина V и слабой интенсивностью флуоресценции 7-AAD (в стадии раннего апоптоза, рис. 2б, нижний правый квадрант). Количество клеток в стадии раннего апоптоза при этом увеличивалось с 7 до 36%, количество же мертвых клеток возрастало на 13%: с 41 до 54%. Добавление 10 мкг/мл препарата в инкубационную среду приводило к интенсивному окрашиванию клеток обоими красителями (рис. 2в), что свидетельствовало о почти полной их гибели – 93%, только 6% клеток оставались в стадии раннего апоптоза.

Гистограмма окрашивания DCFH-DA показала распределение клеток в контрольной пробе и в пробе с воздействием цисплатином в концентрации 5 мкг/мл на 2 фракции: слабо флуоресцирующих и сильно флуоресцирующих клеток (рис. 3а), при этом для второй из перечисленных популяций было выявлено повышение интенсивности флуоресценции после добавления цисплатина по сравнению с контролем (рис. 3а, синяя стрелка). Добавление высокой концентрации препарата привело к образованию одной фракции со слабой флуоресценцией DCF. Окрашивание клеток DCFH-DA в сочетании с окрашиванием 7-AAD и ФЭ-Аннексином V позволило охарактеризовать клетки из сильно и слабо флуоресцирующих по DCF фракций по типу и стадии клеточной гибели. Основную часть кривых со слабой флуоресценцией составили позитивные по 7-AAD и ФЭ-Аннексину V, т.е. мертвые клетки (рис. 3б), при этом можно отметить, что добавление 10 мкг/мл препарата привело к снижению флуоресценции у этой фракции клеток по отношению к контрольной.

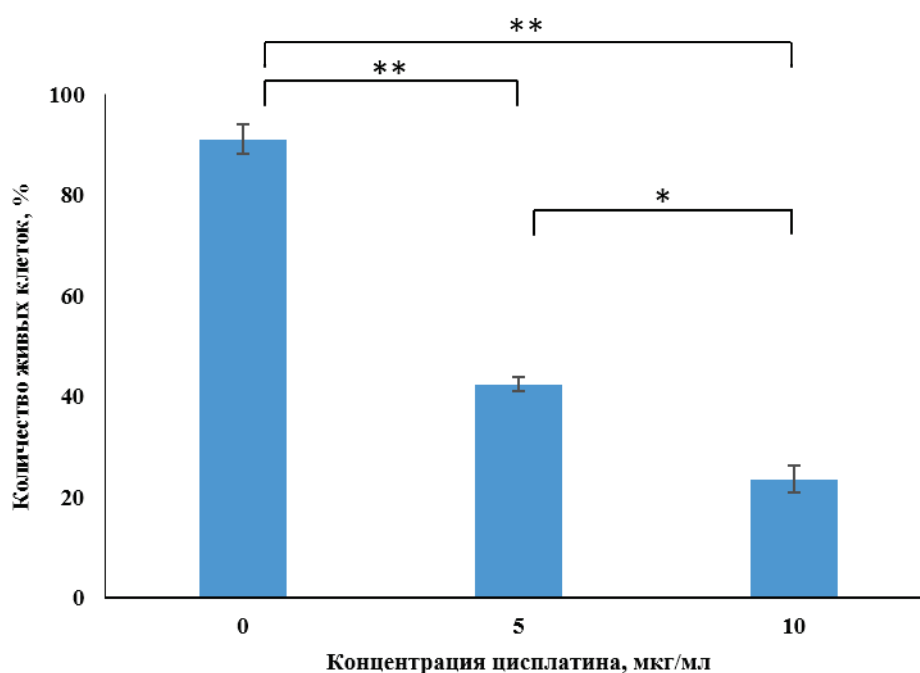


Рисунок 1. Количество живых клеток линии HeLa Kyoto при воздействии при воздействии цисплатином в течение 24 часов (окрашивание трипановым синим). * $p \leq 0,0001$, ** $p < 0,00001$

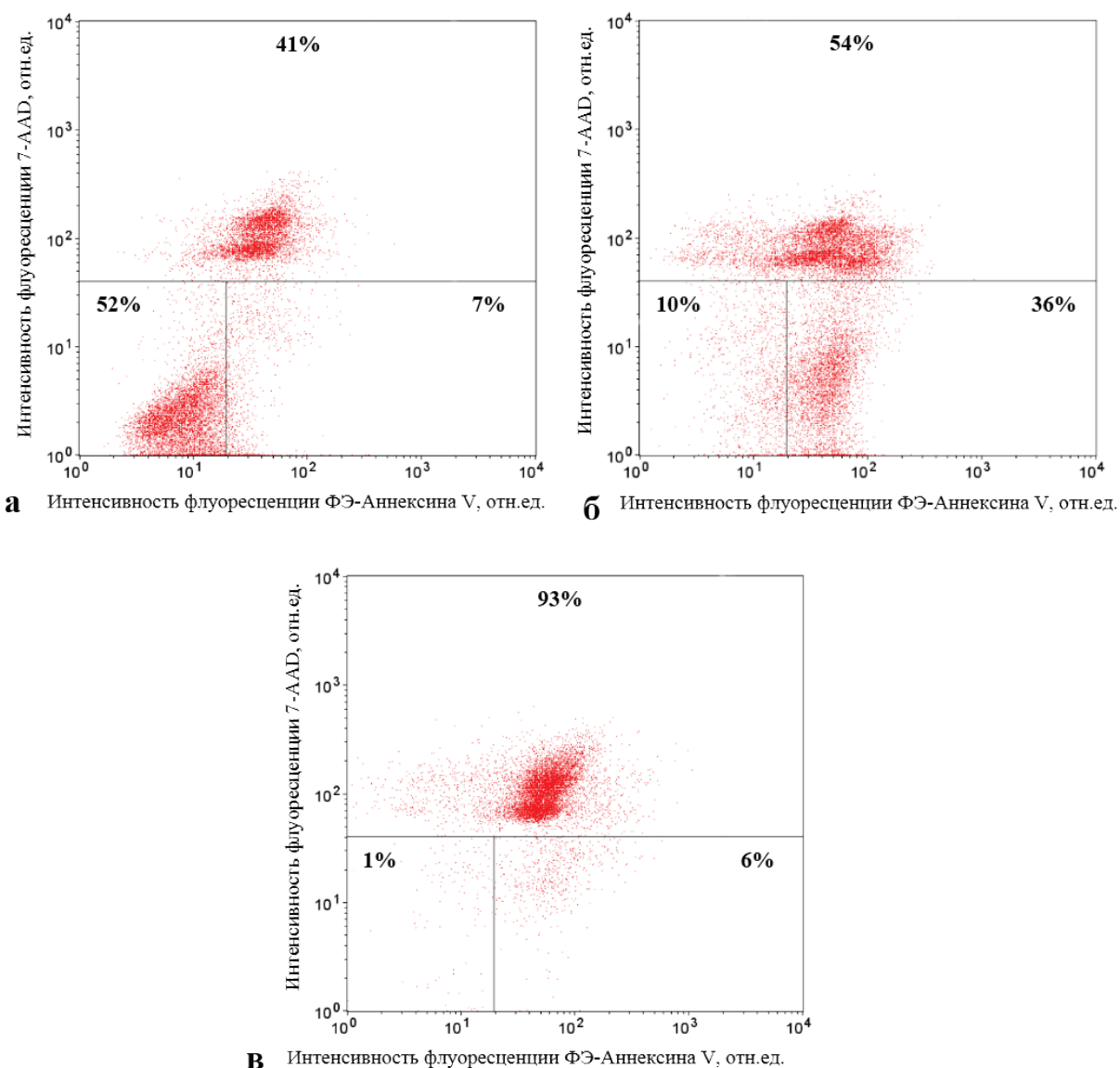


Рисунок 2. Распределение клеток HeLa Kyoto по интенсивности флуоресценции ФЭ-Аннексином V и 7-AAD при воздействии цисплатином в течение 24 часов: а) 0 мкг/мл (контроль); б) 5 мкг/мл; в) 10 мкг/мл

Большинство жизнеспособных, слабо окрашивающихся ФЭ-Аннексином V и 7-AAD, клеток сильно окрашиваются DCFH-DA (рис. 36). Необходимо отметить, что интенсивность флуоресценции клеток, подвергшихся воздействию цисплатина в количестве 5 мкг/мл, выше, чем интенсивность флуоресценции контрольных клеток – медианное значение интенсивности флуоресценции составило 115 отн.ед. против 81 отн. ед. в контроле, в то время, как у клеток в стадии раннего апоптоза интенсивность флуоресценции правых пиков в контроле выше, чем у клеток после воздействия препарата в концентрации 5 мкг/мл: медиана контрольных 312 отн. ед., после инкубации с 5 мкг/мл цисплатина – 158 отн. ед.

ОБСУЖДЕНИЕ

Окрашивания клеток HeLa Kyoto трипановым синим показало выраженный цитотоксический эффект препарата, экспозиция с 5 мкг/мл цисплатина приводило к гибели более половины клеточной популяции. Увеличение концентрации препарата приводило к увеличению процента гибели клеточной культуры, приводя к почти полной её гибели. Данные результаты сочетаются с проведенными ранее исследованиями [17]. «Миграция» клеток из популяции слабоокрашенной ФЭ-Аннексином V и 7-AAD в популяцию с высокой интенсивностью флуоресценции ФЭ-Аннексина V и слабой интенсивностью флуоресценции 7-AAD при воздействии 5 мкг/мл цисплатина позволила предположить, что большинство клеток, подвергающихся обработке препаратом, перед гибелью проходят стадию раннего апоптоза.

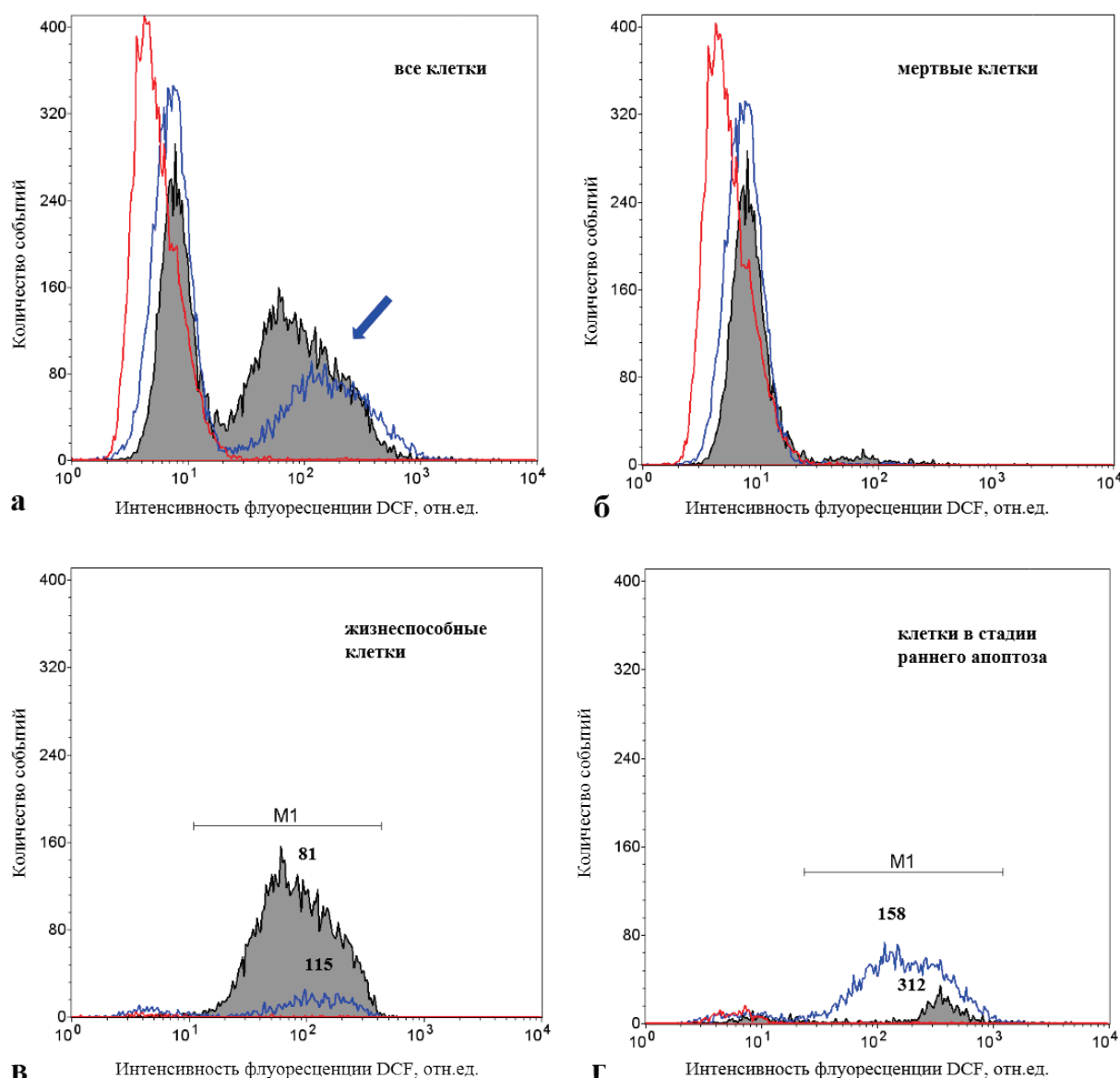


Рисунок 3. Гистограммы интенсивности флуоресценции окрашенных DCFH-DA клеток при воздействии цисплатином в течение 24 часов; черная линия с серым наполнением – 0 мкг/мл (контроль), синяя линия – 5 мкг/мл, красная линия – 10 мкг/мл: а) все клетки, б) мертвые клетки, в) жизнеспособные клетки, г) клетки в стадии раннего апоптоза. Стрелкой указано увеличение флуоресценции DCF в ответ на добавление цисплатина в концентрации 5 мкг/мл. M1 – область анализируемых значений

Анализируя данные по окрашиванию клеток всеми тремя флуоресцентными красителями можно допустить, что уменьшение флуоресценции DCFH-DA в мертвых клетках связано с утечкой АФК через поврежденные мембраны клеток и/или с окончанием в них процесса апоптоза. Интенсивное окрашивание жизнеспособных клеток DCFH-DA свидетельствует об активно идущих окислительных процессах и высоком уровне АФК, добавление 5 мкг/мл препарата еще больше увеличивало содержания АФК в клетках. Это свидетельствует о том, что, накопление АФК осуществляется на самых ранних стадиях развития апоптоза, до экстернализации фосфатидилсерина. В то же время уровень АФК в апоптотных оборотанных 5 мкг/мл цисплатина клетках ниже, чем в клетках, не обработанных препаратом. Таким образом, можно предположить, что добавление цисплатина приводит к увеличению не всех АФК, а лишь каких-то определенных групп, количество которых уменьшается на стадиях раннего апоптоза по сравнению с необработанными клетками. Сниженное количество АФК в обработанных препаратом клетках может быть связано как с угнетением процессов их синтеза, так и с возможным усилением процессов их утилизации в результате действия защитных механизмов клеток.

Необходимо отметить, что процент жизнеспособных клеток в контроле и при воздействии цисплатина, определенный методом проточной цитофлуориметрии ниже, чем при окрашивании трипановым синим. Это может быть связано с дополнительным воздействием на клетки в процессе их снятия с подложки и трехкратном центрифугировании для анализа на проточном цитофлуориметре. Кроме того, при окрашивании трипановым синим нельзя выделить клетки в стадии раннего апоптоза, которые при данном способе окрашивания, вероятно, выглядят как жизнеспособные.

DCFH-DA часто используется для определения общего уровня АФК [18, 19] В ряде работ, исследования в которых проводились методом проточной цитофлуориметрии, приводятся аналогичные данные, свидетельствующие о том, что цисплатин индуцирует увеличение продукции активных форм кислорода [20]. Показано, что цисплатин в высоких концентрациях (20 мкг/мл) снижает жизнеспособность клеток в зависимости от времени воздействия, одновременно со значительным увеличением продукции внутриклеточных АФК [21]. В перечисленных работах общий пул АФК определялся одновременно как в жизнеспособных, так и погибающих клетках. Marullo и др., с использованием 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеинового диацетатного зонда, при воздействии цисплатином в концентрации IC₅₀ и, как в нашей работе, продемонстрировали увеличение уровня АФК отдельно в жизнеспособных клетках. Авторы сделали вывод об участии АФК в самых ранних стадиях ответа клеток на действие данного химиотерапевтического препарата [11]. Количество АФК в клетках, претерпевающих апоптоз, в данной работе не анализировалось.

В работе Choi Y.-M. И др. показано, что цисплатин увеличивает количество АФК по причине митохондриальной дисфункции. Это было доказано совместным окрашиванием двумя красителями Mito-tracker-Red CMX и DCFH-DA. Результаты ко-локализации показали, что индуцированная цисплатином генерация митохондриальных АФК ассоциирована с ухудшением состояния митохондрий в клетках [8]. Другой причиной накопления АФК при воздействии цисплатином как на нормальные так и на опухолевые клетки является повышение активности НАДФН-оксидаз [9, 21].

С использованием DCFH-DA трудно сделать вывод об изменении уровня конкретных форм АФК. Так, например, DCFH непосредственно с H₂O₂ не реагирует, но при одноэлектронном окислении DCFH образуется активный промежуточный радикал DFC[•], который быстро реагирует с O₂ с образованием супероксида. В тоже время дисмутация O₂^{•-} приводит к образованию H₂O₂ [22]. Существует предположение, что для флуоресценции DCF требуется одновременное присутствие в цитозоле либо DCFH, H₂O₂ и Fe (II), либо DCFH и цитохрома C [23]. Кроме одноэлектронных окислителей, таких, как гидроксильный радикал HO[•], пероксинитрит ONOO⁻ и т.д., DCFH может окисляться активными редокс-металлами, например Fe²⁺ в присутствии кислорода O₂ [24]. Таким образом, для более точного ответа на вопрос, какие формы АФК принимают участие в ответе опухолевых клеток на действие цисплатина, необходимо использовать дополнительные методы исследования. Тем не менее можно утверждать, что АФК принимают участие в процессе цисплатин-индуцированной гибели клеток HeLa Kyoto на самых ранних ее стадиях.

ВЫВОДЫ

Наше исследование показало, что при воздействии цисплатина основная часть клеток HeLa Kyoto погибает по пути апоптоза. Было показано, что обработка цисплатином приводит к увеличению АФК и уровня окислительных процессов в жизнеспособных клетках, клетки, переживающие ранний апоптоз, при этом характеризовались более низким уровнем АФК в сравнении с контрольными, необработанными препаратом, клетками. Сделано предположение о том, что добавление цисплатина приводит к увеличению не всех АФК, а лишь каких-то определенных групп, количество которых уменьшается на стадиях раннего апоптоза по сравнению с необработанным препаратом клетками.

Список литературы / References:

1. Sztatowski T.P., Nathan C.F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, pp. 794-798.
2. Toyokuni S., Okamoto K., Yodoi J., Hiai H. Pers is tent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.*, 1995, vol. 358, pp. 1-3.
3. Liou G.-Y., Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.*, 2010, vol. 44, no. 5, pp. 479-496.
4. Trachootham D., Alexandre J., Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2009, vol. 8, no. 7, pp. 579-591.
5. Conklin K.A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integrative Cancer Therapies*, 2004, vol. 3, no. 4, pp. 294-300.
6. Florea A.-M., Bus selberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 2011, vol. 3, no. 1, pp. 1351-1371.
7. Loskotova H., Brabec V. DNA interactions of cisplatin tethered to the DNA minor groove binder distamycin. *Eur. J. Biochem.*, 1999, vol. 266, pp. 392-402.
8. Choi Y.-M., Kim H.-K., Shim W., Anwar M.A., Kwon J.-W., Kwon H.-K., Kim H.J., Jeong H., Kim H.M., Hwang D., Kim H.S., Choi S. Mechanism of Cisplatin-Induced Cytotoxicity Is Correlated to Impaired Metabolism Due to Mitochondrial ROS Generation. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 8, p. 21.
9. Kim H.-J., Lee J.-H., Kim S.-J., Oh G.S., Moon H.-D., Kwon K.-B., Park C., Park B.H., Lee H.-K., Chung S.-Y., Park R., So H.-S. Roles of NADPH Oxidases in Cisplatin-Induced Reactive Oxygen Species Generation and Ototoxicity. *JNeurosci*, 2010, vol. 30, no. 11, pp. 3933-3946.
10. Guo J, Xu B., Han Q., Zhou H., Xia Y., Gong C., Dai X., Li Z., Wu G. Ferroptosis: A Novel Anti-tumor Action for Cisplatin. *Cancer Res. Treat.*, 2018, vol. 50, no. 2, pp. 445-460.

11. Marullo R., Werner E., Degtyareva N., Moore B., Altavilla G., Ramalingam S., Doetsch P. Cisplatin Induces a Mitochondrial-ROS Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 11, p. 15.
12. Pavelescu L.A. On reactive oxygen species measurement in living systems? *J. Med. Life*, 2015, vol. 8, pp. 38-42.
13. 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, vol. 5, no. 2, pp. 113-121.
14. Louis K.S., Siegel A.C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol. Biol.*, 2011, vol. 740, pp. 7-12.
15. Burow S., Valet G. Flow-cytometric characterization of stimulation, free radical formation, peroxidase activity and phagocytosis of human granulocytes with 2,7-dichlorofluorescein (DCF). *Eur. J. Cell. Biol.*, 1987, vol. 43, pp. 128-133.
16. Rothe G., Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2,7-dichlorofluorescein. *J. Leukoc. Biol.*, 1990, vol. 47, pp. 440-448.
17. Белова А.С., Орлова А.Г., Брилкина А.А., Масленникова А.В. Чувствительность клеток линии Hela Kyoto трансфицированных сенсором HyPer2 к действию цисплатина. *CTM*, 2014, т. 6, № 4, с. 7-13. [Belova A.S., Orlova A.G., Brilkina A.A., Maslennikova A.V., The sensitivity of Hela Kyoto cell line transfected with sensor HyPer2 to cisplatin. *STM*, 2014, vol. 6, no. 4, pp. 7-13. (In Russ.)]
18. Crow J.P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*, 1997, vol. 1, pp. 145-157.
19. Wang H., Joseph J.A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, vol. 27, pp. 612-616.
20. Franskevych D.V., Grynyuk I.I., Prylutska S.V., Matyshevska O.P. Modulation of cisplatin-induced reactive oxygen species production by fullerene C(60) in normal and transformed lymphoid cells. *Ukr. Biochem. J.*, 2016, vol. 88, pp. 44-50.
21. 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, vol. 45, no. 9, pp. 1033-1039.
22. Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies K.J.A., Dennery P.A., Forman H.J., Grisham M.B., Mann G.E., Moore K., Jackson Roberts II L., Ischiropoulos H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012, vol. 52, no. 1, p. 6.
23. Karlsson M., Kurz T., Brunk U.T., Nilsson S.E., Frennesson C.I. What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem. J.*, 2010, vol. 428, pp. 183-190.
24. Qian S.Y., Buettner G.R. Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological and free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, vol. 26, pp. 1447-1456.

CHANGE IN THE LEVEL OF ROS IN HELA KYOTO CELLS AT DIFFERENT STAGES OF CISPLATIN-INDUCED CELL DEATH

Shchukina K.M.¹, Nerush A.S.², Orlova A.G.²

¹ Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod
Gagarin Avenue, 23, 603950, Nizhny Novgorod, Russia

² Institute of Applied Physics RAS

Ulyanov Street, 46, 603950, Nizhny Novgorod, Russia; e-mail: ksushaschukina1995@yandex.ru

Abstract. Cisplatin is a chemotherapeutic drug, successfully used in the treatment of a wide range of tumors. This drug can cause mitochondrial dysfunction and increased production of reactive oxygen species (ROS), which leads to the damage of membrane, DNA and other important cell elements. The aim of the study was to investigate the changes in the level of ROS at different stages of cell death caused by cisplatin. We used the HeLa Kyoto cell line, the fluorescent dye DCFH-DA, the marker of apoptosis PE-Annexin V, and the vital dye 7-actinaminomycin D. Using flow cytometry, it was shown that after treatment most of viable cells are intensely stained with DCFH-DA, which indicates active oxidation processes and high level of ROS. At the stage of early apoptosis, the amount of ROS decreases as compared to the untreated cells.

Key words: cisplatin, reactive oxygen species, apoptosis.