

МОНИТОРИНГ ПРОДУКЦИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ В ОТВЕТ НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ

Горохова А.А., Пескова Н.Н., Брилкина А.А., Шилягина Н.Ю., Балалаева И.В.

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,

Институт биологии и биомедицины

пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: anastasiya-dosaeva@yandex.ru

Поступила в редакцию: 14.07.2018.

Аннотация. Интерес к пероксиду водорода обусловлен его двойной ролью – участием в развитии свободно-радикального окисления и выполнением функции сигнальной молекулы, принимающей участие в регуляции множества клеточных процессов. *HyPer* является флуоресцентным сенсором белковой природы, который позволяет регистрировать динамику изменения внутриклеточной концентрации H_2O_2 . В ходе работы нами была получена стабильно трансфицированная линия эпидермоидной карциномы человека A431-*HyPer*. Было экспериментально показано, что проведенная трансфекция не оказала существенного влияния на устойчивость к фотодинамическому воздействию с препаратом Фотодитазин®. С использованием полученной линии A431-*HyPer* зарегистрировано монотонное увеличение содержания H_2O_2 в цитоплазме клеток, предынкубированных с фотодитазином, в течение получаса после облучения в дозе 50 Дж/см². Увеличение содержания H_2O_2 в течение сравнительно длительного времени после облучения позволяет говорить о его продукции в ходе вторичных процессов, развивающихся вследствие фотодинамического воздействия.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия (ФДТ), пероксид водорода, белковый сенсор *HyPer*, фотодитазин.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является разновидностью химиотерапии, основанной на фотохимической реакции, катализатором которой является кислород, активированный флуоресцентным красителем-фотосенсибилизатором (ФС) и воздействием лазерного излучения [1, 2]. Уникальность данного метода при лечении онкологических заболеваний заключается в относительно избирательном накоплении в опухолевой ткани фотосенсибилизатора, способного при локальном воздействии света с длиной волны, соответствующей его максимуму поглощения, генерировать цитотоксические агенты, обладающие поражающим действием и способные вызывать гибель опухолевых клеток. При облучении светом патологического участка, молекула фотосенсибилизатора в нем переходит в возбужденное состояние и может вступать в реакции двух типов. Фотохимические реакции I типа – реакции, при которых фотосенсибилизатор принимает непосредственное участие в окислительно-восстановительных процессах с переносом электронов или протонов и образованием промежуточных радикальных продуктов, которые затем взаимодействуют с кислородом в ткани. Фотохимические реакции II типа – реакции, в результате которых избыток энергии от ФС непосредственно передается молекуле кислорода в ткани, в результате чего он переходит в возбужденное синглетное состояние [1, 3]. В настоящее время наиболее распространены фотосенсибилизаторы следующих групп: препараты на основе производных гематопорфирина, производных хлоринов и бактериохлоринов, производных порфиразинов (фталоцианинов), а также препараты на основе 5-аминолевулиновой кислоты, предшественника эндогенного протопорфирина IX [4].

Активные формы кислорода (АФК), образующиеся в ходе фотохимических реакций, инициируют цепной вырожденно-разветвленный свободнорадикальный процесс, приводящий к окислению различных биополимеров, нарушению работы мембранных структур, и, в конечном итоге, гибели клетки [3]. К основным АФК относят производные кислорода радикальной природы: супероксид-радикал (анион-радикал), гидроперекисный радикал, гидроксил-радикал, а также его реактивные производные (перекись водорода, синглетный кислород) [5]. В качестве основного эффектора фотодинамической реакции долгое время рассматривался лишь синглетный кислород [6, 7]. Однако всё большее количество данных свидетельствует о значительном вкладе других активных форм кислорода (АФК), в первую очередь пероксида водорода [8, 9]. Пероксид водорода имеет довольно длительное время жизни молекулы – около 1 мс, что позволяет молекуле H_2O_2 не только диффундировать через мембраны, но и, по-видимому, «проходить» значительные расстояния от места образования. Интерес к пероксиду водорода обусловлен еще и тем, что, наряду со свойствами окислителя, он еще и является участником сигнальных каскадов и выступает в качестве вторичного мессенджера [10]. H_2O_2 участвует в передаче сигнала благодаря свойству обратимо и специфично модифицировать некоторые аминокислотные остатки в составе белков. Обратимые модификации могут существенно влиять на конформацию белка, изменяя его функциональность или взаимодействия с другими белками [11]. Учитывая вышесказанное, можно предположить, что продукция пероксида водорода при фотодинамическом воздействии может опосредовать локальный тканевой и даже, возможно, системный ответ.

К настоящему времени предложено множество методов определения содержания H_2O_2 в биологических объектах. Методы определения содержания H_2O_2 , основанные на использовании низкомолекулярных флуоресцентных зондов (Amplex Red, DCFH-DA, Peroxy Green и др.), а также спектрофотометрические методы

с использованием ферритиоцианата, субстрата пероксидазы тетраметилбензида или ксиленолового оранжевого отличаются между собой по чувствительности и специфичности, однако их общим ограничением является необратимость реакции субстрата с пероксидом водорода, что делает невозможным проведение динамических исследований [12].

HuPer (от Hydrogen Peroxide) является первым флуоресцентным генетически кодируемым сенсором, который не только обладает высокой специфичностью к пероксиду водорода, но и позволяет проводить динамические исследования с возможностью детектирования изменения уровня H_2O_2 на уровне целого организма, клетки или отдельного клеточного компартмента [13]. Этот белок получен путем циклической пермутации желтого флуоресцентного белка (cpYFP) и слияния его новообразованных C- и N- концов с двумя доменами прокариотического пероксид-специфичного транскрипционного фактора OxyR. Для HuPer характерно наличие двух пиков возбуждения флуоресценции, при 420 нм и 500 нм, и один пик эмиссии с максимумом при 516 нм. В присутствии пероксида для биосенсора наблюдается пропорциональное увеличение интенсивности возбуждения при 500 нм и уменьшение при 420 нм, что позволяет реализовывать ратиометрический подход и проводить измерения в сложной внутриклеточной среде при отсутствии информации о концентрации сенсора [13, 14]. Обратное восстановление HuPer осуществляется при участии глутаредоксина, что позволяет проводить многократные измерения внутри одной и той же клетки или клеточной структуры.

Высокая чувствительность к H_2O_2 , скорость реакции (константа скорости $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) и её обратимость делают HuPer довольно ценным инструментом в наблюдениях за динамикой пероксида в живых системах в реальном времени. Благодаря бактериальной природе регуляторного домена OxyR биосенсор HuPer не имеет природных партнеров в эукариотической клетке, поэтому он менее подвержен возможному посттрансляционному модификациям и нетоксичен при гиперэкспрессии [14, 15].

В связи с этим, целью нашей работы стало создание стабильно трансфицированной линии клеток эпидермоидной карциномы человека, экспрессирующей в цитоплазме флуоресцентный генетически кодируемый сенсор HuPer, и демонстрация возможности её использования для изучения динамики вторичной продукции пероксида водорода при фотодинамическом воздействии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная культура.

В качестве исходной клеточной линии нами была использована линия эпидермоидной карциномы человека A431 (ATCC® CRL-1555™). Клетки культивировали при 37 °C в атмосфере 5 % CO_2 на питательной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с глутамином и 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (HuClone, США). Для снятия клеток с культуральной подложки использовали трипсин:ЭДТА (1:1) (ПанЭко, Россия), а для промывки клеток – фосфатно-солевой буфер (PBS).

Липофекция.

В качестве вектора для трансфекции использовали плазмиду pHuPer-cyto (Евроген, Россия), содержащую ген флуоресцентного белка HuPer под контролем цитомегаловирусного промотора и ген устойчивости к антибиотику генетицину (Invitrogen, США).

Трансфекцию выполняли методом липофекции с реагентом Lipofectamin 2000 (Invitrogen, США). На первом этапе проведения липофекции клетки высаживали на 24-луночный планшет в количестве 50×10^3 клеток на лунку и инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение суток. Затем к клеткам добавляли липокомплекс (смешанный в питательной среде трансфицирующий реагент, содержащий липидные везикулы Lipofectamin 2000 и плазмиду pHuPer-cyto). Комплекс ДНК: липид готовили в соотношении 1:3. Клетки инкубировали с липокомплексом в течение 24 часов, после чего заменяли среду на обычную ростовую и инкубировали еще в течение 48 часов. Затем с целью предварительной селекции трансфицированных клеток их помещали на среду с генетицином. Добавление антибиотика осуществляли на первом пассаже после липофекции, начиная с концентрации 300 мкг/мл и постепенно увеличивая до 2000 мкг/мл при пересадке.

Оптическая сортировка клеток.

Отселектированные на среде с антибиотиком культуры клеток были отсортированы на оптическом проточном цитофлуориметре-сортере FACS Aria III (BD, США). После процедуры снятия с подложки клетки центрифугировали при 200g и ресуспендировали в питательной среде до концентрации 10^7 клеток/мл.

Оптическую сортировку клеток осуществляли через сопло с диаметром 100 мкм с давлением 35 psi. Регистрировали флуоресценцию клеток в диапазоне 515-545 нм при возбуждении на длине волны 488 нм. Для дальнейшего культивирования отбирали популяции клеток с максимально яркой флуоресценцией. Сбор клеток производили в пробирки объемом 1,5 мл с культуральной средой DMEM с 20 % бычьей эмбриональной сыворотки и антибиотиками: канамицин, пенициллин-стрептомицин, гентамицин для предотвращения появления бактериальной инфекции.

После сортировки клетки высаживали на 24-луночный планшет и инкубировали в течение 48 часов. Затем, в зависимости от количества клеток, их пересаживали на 6-луночный планшет или культуральный флакон с площадью дна 25 см².

Были выполнены три последовательных цикла сортировки-наращивания клеток, что позволило отобрать наиболее яркую популяцию стабильно трансфицированных клеток. Стабильность трансфекции подтверждали сохранением флуоресценции HuPer в клетках при длительном культивировании.

Фотосенсибилизатор.

В работе использовали препарат хлоринового ряда Фотодитазин® (Fotoditazin) (ООО «БЕТА-ГРАНД», Россия), содержащий хлорин еб с N-метил-D-глюкаминном и натрий в следующих мольных соотношениях: 1:2:1, с максимумом поглощения при $\lambda=662$ нм.

Определение темновой токсичности и фотодинамической активности красителя.

Для оценки цитотоксичности исследуемого ФС проводили МТТ-тест (микрочолориметрический тест), основанный на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромида (МТТ-реагента) до сине-фиолетового водонерастворимого кристаллического формазана [16].

Для оценки темновой токсичности и фотодинамической активности исследуемого ФС клетки высевали на 96-луночный планшет в количестве 4×10^3 на лунку и инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение суток. Затем питательную среду в культуральном планшете заменяли на среду с фотосенсибилизатором (в разных концентрациях) и инкубировали клетки в течение 4 часов. После окончания инкубации среду с фотосенсибилизатором в лунках планшета заменяли на стандартную ростовую среду.

Для исследования фотодинамической активности клетки облучали в дозах 2 и 5 Дж/см² ($\lambda = 615$ -635 нм, плотность мощности 20 мВт/см²) с помощью светодиодного излучателя для получения равномерного светового потока в стандартных 96-луночных планшетах при термостатировании (37 °С) [17]. Для исследования темновой токсичности планшеты аналогичное время выдерживали вне CO_2 -инкубатора, но в темноте.

Жизнеспособность клеточной культуры оценивали через 24 ч после облучения. В ростовую среду вносили МТТ-реагент (Alfa Aesar, Великобритания) в концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали клетки в течение 4 часов. Далее инкубационную среду отбирали, а кристаллы образованного окрашенного МТТ-формазана растворяли в 100 мкл ДМСО. Измерение оптической плотности содержимого каждой лунки проводили на планшетном спектрофотометре Synergy MX (BioTek, США) при длине волны 570 нм. Жизнеспособность клеток оценивали по отношению значения оптической плотности раствора формазана в каждой пробе к контролю (без ФС). Полученные зависимости «доза-эффект» использовали для расчета дозы облучения и концентрации фотосенсибилизатора, приводящей к ингибированию роста культуры клеток на 50 % – значения IC₅₀.

Конфокальная микроскопия.

Изображения клеток получали с помощью системы лазерной сканирующей конфокальной микроскопии Axio Observer Z1 LSM 710 NLO DUO (Carl Zeiss, Германия).

Клетки А431-НуРег предварительно выращивали в тонкодонных чашках Петри. Все эксперименты проводили в условиях камеры микроскопа, обеспечивающей контроль температуры 37 °С и содержания CO_2 в атмосфере 5 %.

Для получения изображения клеток использовали регистрацию прошедшего через объект лазерного излучения. Флуоресценцию белка НуРег возбуждали последовательно на двух длинах волн: 405 нм и 488 нм. Выбор длин волн был обусловлен лазерами, входящими в комплектацию микроскопа, и максимально близко соответствует пикам спектра возбуждения НуРег, регистрацию флуоресценции осуществляли в диапазоне 500-560 нм. Оценку уровня пероксида водорода проводили по изменению отношения I_{488}/I_{405} полезных сигналов флуоресценции клеток при соответствующих длинах волн возбуждения.

При исследовании внутриклеточной локализации красителя фотодитазин добавляли к трансфицированным клеткам в концентрации 5 мкМ и инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение 4 часов. Для регистрации флуоресценции фотодитазина использовали лазер 633 нм, сигнал регистрировали в диапазоне 650-710 нм.

При мониторинге ответа на фотодинамическое воздействие предварительная инкубация с фотодитазином составляла 30 минут. Для фотодинамического воздействия клетки облучали светом с длиной волны 633 нм в дозе 50 Дж/см².

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами получена линия клеток эпидермоидной карциномы человека с экспрессией сенсора НуРег в цитоплазме. В качестве исходной линии была использована линия А431, выбор которой обусловлен тем, что наиболее часто ФДТ применяется именно при раке кожи.

Для получения линии клеток был использован метод липофекции. После внесения в среду липокомплекса с плазмидой, несущей ген НуРег, и первичной селекции на среде с антибиотиком были получены культуры клеток, демонстрирующие характерную для белка НуРег зеленую флуоресценцию при возбуждении синим цветом. Такой метод селекции позволяет частично, но не полностью избавиться от нетрансфицированных клеток, поэтому отселектированные на среде с антибиотиком культуры клеток были отсортированы на оптическом проточном цитофлуориметре-сортере. Популяция клеток с наибольшим уровнем сигнала была собрана для последующего культивирования. С целью выделения стабильных трансфектантов цикл сортировка-культивирование был повторен трижды. Для итоговой линии, названной А431-НуРег, было подтверждено сохранение сигнала флуоресценции НуРег в течение более чем 25 пассажей, а также в ходе процедуры заморозки/разморозки культуры. Ростовые параметры, способность к адгезии и морфология клеток не отличались от родительской линии.

Как показано на рисунке 1А, флуоресцентный белок НуРег равномерно распределяется в цитоплазме и ядре клеток полученной линии, что, с учетом сенсорных свойств данного белка, позволяет проводить оценку

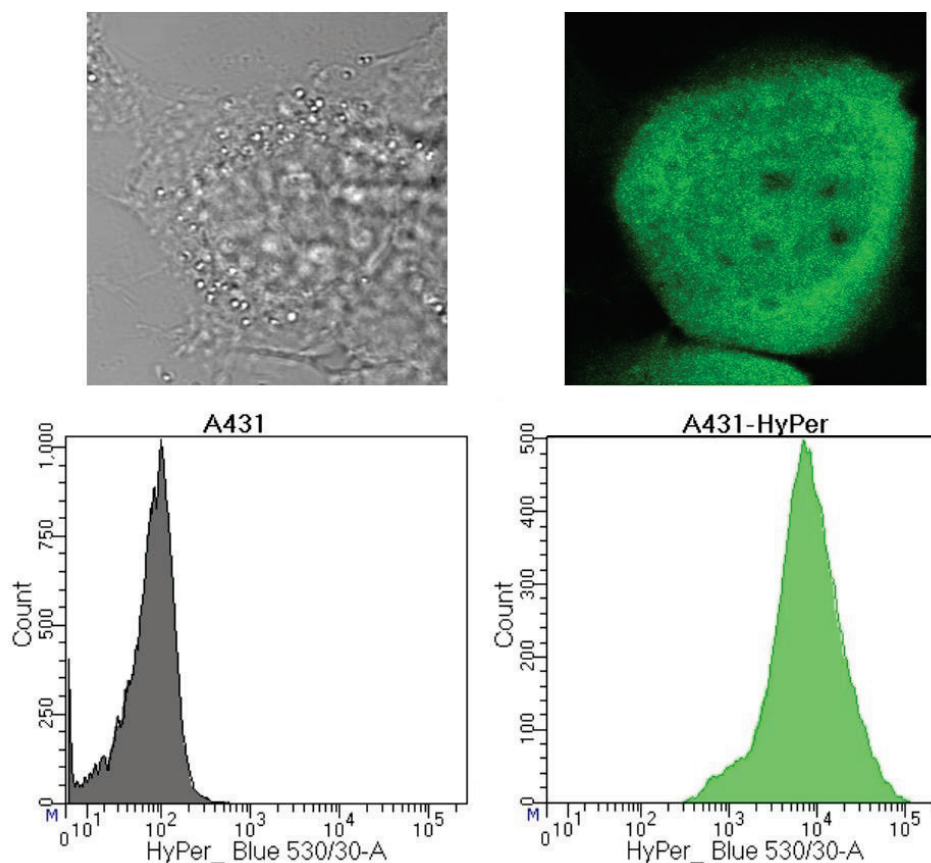


Рисунок 1. Стабильно трансфицированная линия клеток А431-НуPer, экспрессирующая в цитоплазме H_2O_2 -чувствительный белок НуPer: А – изображение клетки линии А431- НуPer на просвет (слева) и при регистрации флуоресценции НуPer, λ_{ex} 488 нм, λ_{em} 500-560 нм (справа). Размер изображений 40 мкм×45 мкм; Б – распределение по уровню сигнала флуоресценции клеток исходной линии А431 (слева) и полученных путем трансфекции геном НуPer клеток линии А431-НуPer (справа). Метод проточной цитометрии, λ_{ex} 488 нм, λ_{em} 515-545 нм

содержания пероксида водорода в данных компартментах клетки. Сигнал флуоресценции клеток А431-НуPer в соответствующей спектральной области на два порядка превышает сигнал автофлуоресценции клеток родительской линии А431 (рис. 1Б), при этом наблюдается достаточно узкое распределение клеток по уровню сигнала.

Полученная клеточная линия была использована для исследования вторичной продукции пероксида водорода, индуцированной в клетках фотодинамическим воздействием. В качестве фотосенсибилизатора нами был использован препарат хлоринового ряда Фотодитазин, широко используемый для ФДТ опухолей различных локализаций [18, 19].

Анализ внутриклеточной локализации фотодитазина был выполнен с использованием полученной клеточной линии с экспрессией флуоресцентного белка НуPer в цитоплазме, а также красителей, специфично окрашивающих такие органеллы, как аппарат Гольджи, лизосомы и ЭПР. Показано, что фотодитазин локализуется в околоядерной области клетки во внутриклеточных мембранных структурах, в основном в ЭПР и аппарате Гольджи (рис. 2). В лизосомах накопления фотодитазина зарегистрировано не было. Такое внутриклеточное распределение может рассматриваться как типичное для хлориновых ФС и было показано ранее на других клеточных линиях [20, 21].

Нами была определена темновая и световая токсичность фотодитазина в отношении используемых исходной и трансфицированной клеточных линий. Это позволило оценить влияние процедуры трансфекции на чувствительность клеток к фотодинамическому воздействию. Кроме этого, данный этап исследования был необходим с точки зрения подбора концентрации и дозы света для последующих экспериментов.

На рисунке 3 хорошо видно, что в отношении обеих культур фотодитазин проявляет выраженную дозозависимую световую активность. Концентрация соединения, приводящая к снижению жизнеспособности культуры клеток на 50 % (IC_{50}), при облучении в дозах 2 и 5 Дж/см² составила около 0,8 и 0,4 мкМ соответственно, при этом IC_{50} в темноте она была не ниже 4 мкМ.

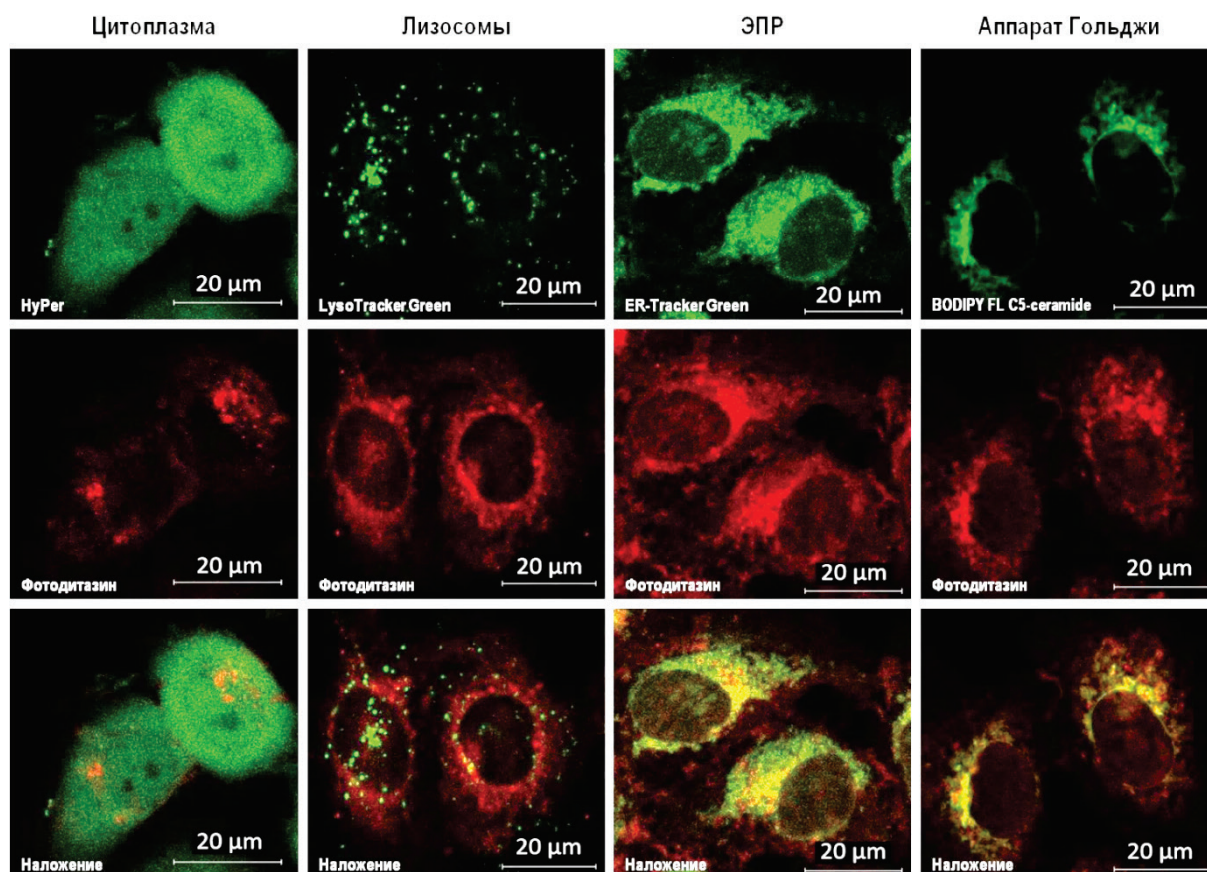


Рисунок 2. Внутриклеточная локализация фотодитазина. Показаны клетки A431-НyPer с экспрессией флуоресцентного белка в цитоплазме и клетки A431, окрашенные специфическими красителями лизосом (LysoTracker), ЭПР (ER-tracker) и аппарата Гольджи (BODIPY FL C5-ceramide). Время инкубации с фотодитазином 30 минут, концентрация 5 мкМ. Флуоресценция НyPer и красителей органелл: λ_{ex} 488 нм, λ_{em} 500-550 нм. Флуоресценция фотодитазина: λ_{ex} 633 нм, λ_{em} 650-735 нм

В таблице 2 представлены значения IC_{50} для используемых культур клеток. Анализ цитотоксичности показал, что для A431 и A431-НyPer характерны схожие значения IC_{50} для данного фотосенсибилизатора, как в темноте, так и на свету. Статистически значимого отличия не выявлено ни при одном варианте обработки. Полученный результат свидетельствует о том, что процедура трансфекции и экспрессия флуоресцентного белка в цитоплазме не оказывают значительного влияния на чувствительность клеток к фотодинамическому воздействию (в условиях освещения). Следовательно, в отношении исследуемых линий клеток могут быть использованы одни и те же световые дозы и концентрации фотосенсибилизатора.

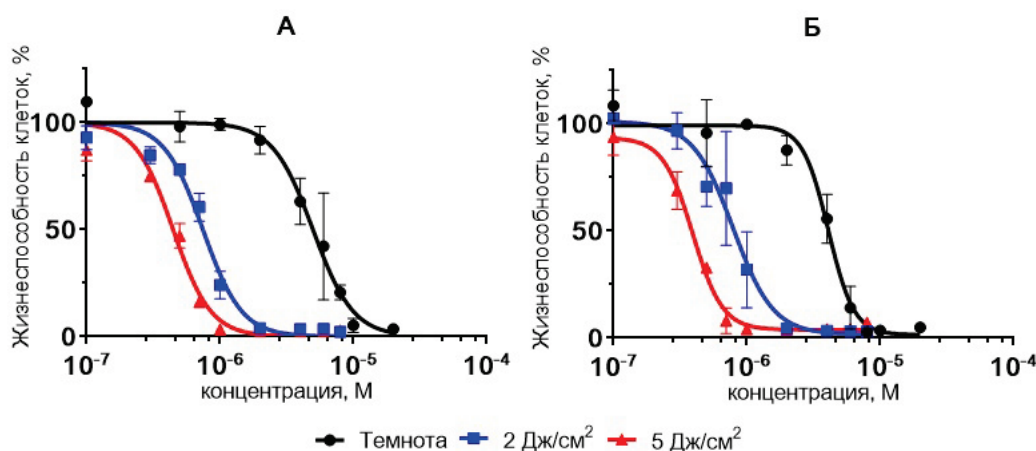


Рисунок 3. Зависимость относительной жизнеспособности клеток A431 (А) и A431-НyPer (Б) от концентрации фотодитазина в темноте и при облучении разными дозами света. λ_{ex} 625 нм, 20 мВт/см². Планки погрешностей представлены стандартным отклонением

Таблица 2. Значения IC_{50} фотодитазина в отношении клеточных линий A431 и A431-HuPer

Линия клеток	IC_{50}^* , мкМ		
	Темнота	2 Дж/см ²	5 Дж/см ²
A431	5,0 [4,5-5,6]	0,75 [0,68-0,82]	0,45 [0,42-0,48]
A431-HuPer	3,8 [3,2-4,5]	0,8 [0,7-0,9]	0,39 [0,36-0,43]

* – значения IC_{50} даны с 95% доверительным интервалом

Полученная линия A431-HuPer позволила провести мониторинг содержания в цитоплазме клеток пероксида водорода в режиме реального времени при фотодинамическом воздействии. Клетки, предварительно проинкубированные с фотодитазином, облучали через объектив микроскопа в дозе 50 Дж/см², после чего в течение 30 минут регистрировали флуоресценцию HuPer при возбуждении на разных длинах волн. Оценка уровня пероксида водорода в клетках проводилась по изменению отношения I_{488}/I_{405} .

В облучаемой области на протяжении этого времени наблюдалось последовательное ухудшение состояния клеток (рис. 4): мембраны клеток образовывали пузырьки, сами клетки сжимались, что можно рассматривать как признаки фотоиндуцированного повреждения клеток. Также после облучения происходило плавное нарастание уровня пероксида водорода в течение всего последующего времени наблюдения. В течение получаса наблюдения отношение I_{488}/I_{405} возросло примерно в 0,8 раза выше исходного, от 1,4 до 1,9 (рис. 5). В отсутствие фотодинамического воздействия такого увеличения не наблюдалось.

В настоящее время ответ на фотодинамическое воздействие рассматривается как сложная реакция, в которой участвуют прооксидантная и антиоксидантная системы, внутриклеточные сигнальные каскады, регуляция работы генома [3]. В частности, повышение содержания активных форм кислорода в митохондриях может привести к индукции апоптоза клетки по митохондриальному пути.

Первичным эффектором при облучении фотосенсибилизаторов хлориновой природы считается 1O_2 [22]. Нами показано, что через некоторое время после фотодинамического воздействия с использованием фотодитазина наблюдается накопление пероксида водорода в цитоплазме клеток. Увеличение содержания H_2O_2 в течение сравнительно длительного времени после облучения позволяет говорить о его продукции в ходе вторичных процессов, развивающихся вследствие фотодинамического воздействия. Механизмы активации вторичной генерации АФК в настоящее время до конца не известны. Тем не менее, можно предположить, что важный вклад в этот процесс вносит отмеченное ранее в ряде работ нарушение работы электрон-транспортных

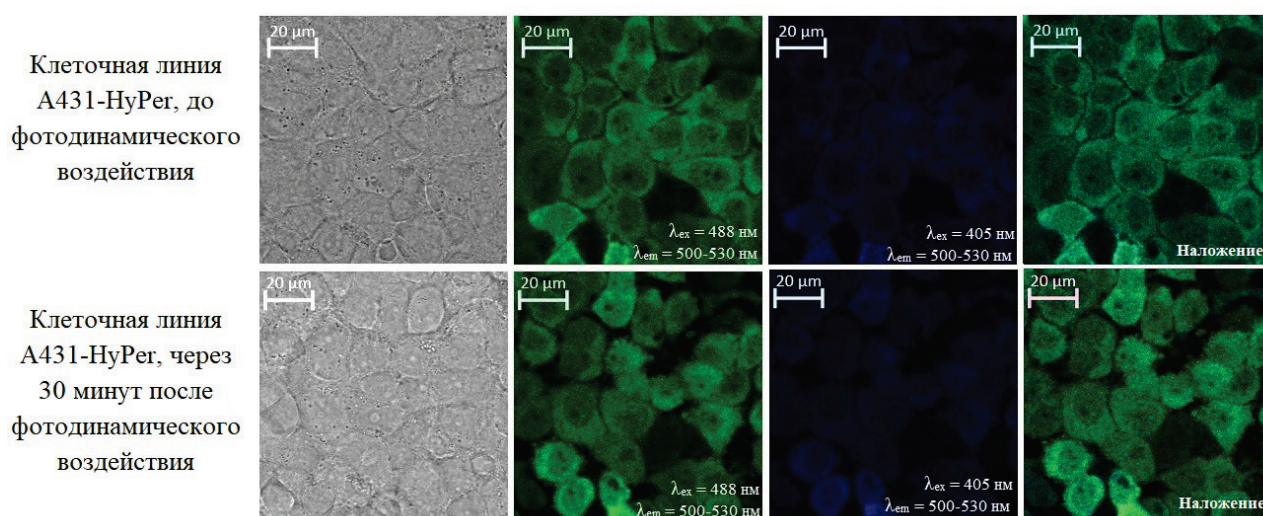


Рисунок 4. Клетки A431-HuPer до и через 30 минут после фотодинамического воздействия. Клетки предварительно проинкубированы с фотодитазином (5 мкМ) в течение 30 минут. Показаны изображения в проходящем свете, флуоресценция HuPer при разном возбуждении и наложение каналов флуоресценции

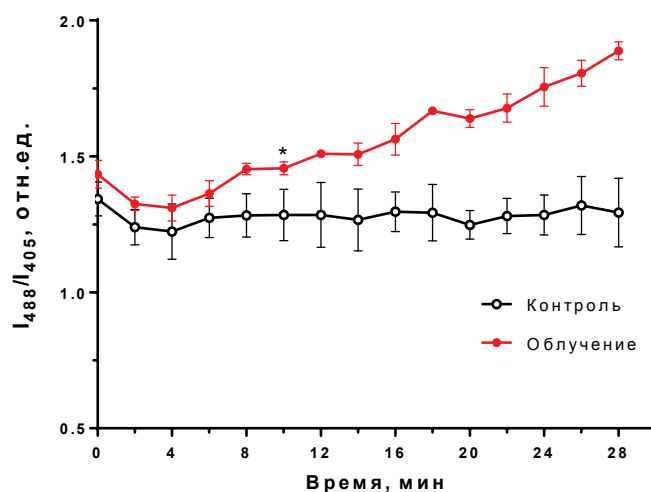


Рисунок 5. Изменение отношения I_{488}/I_{405} флуоресценции сенсора HuPer, свидетельствующее о содержании пероксида водорода, до и после облучения клеток, обработанных фотодитазином. Точка «0» соответствует времени окончания облучения. Статистически значимое отличие между необлученным контролем и облученными клетками зарегистрировано начиная с 10 минут после окончания воздействия (критерий Сидака, $p < 0,05$)

цепей в поврежденных мембранах митохондрий, сопровождающееся увеличением «утечки» электронов на молекулярный кислород [23-25]. Кроме этого, смещению проокислительно-антиокислительного баланса могут способствовать снижение активности каталазы и других антиокислительных ферментов [26], активация ксантиноксидазы [24], а также истощение пула низкомолекулярных антиокислителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предложенный нами подход позволил провести мониторинг изменения уровня пероксида водорода в клетке при фотодинамическом воздействии. Нами было зарегистрировано увеличение показателя I_{488}/I_{405} генетически кодируемого сенсора HuPer, свидетельствующего о повышении содержания пероксида водорода в цитоплазме клеток и коррелирующего с фотоиндуцированными изменениями их морфологии. Выяснение детальных механизмов участия пероксида водорода в ответе на фотодинамическое воздействие требует дальнейшего исследования. Мы полагаем, что использование линий клеток, экспрессирующих генетически кодируемые сенсоры активных форм кислорода, позволит расширить представления об участии различных АФК в механизмах развития фотодинамического ответа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (проект 14.Z50.31.0022) в части получения клеточной линии и РФФИ (грант № 16-04-01676) в части исследований с её использованием.

Список литературы / References:

1. Странадко Е.Ф. Исторический очерк развития фотодинамической терапии. *Лазерная медицина*, 2002, т. 6, № 1, с. 4-8. [Stranadko E.F. Historical outline of the development of photodynamic therapy action. *Lazernaja medicina*, 2002, vol. 6, no. 1, pp. 4-8. (In Russ.)]
2. Гейниц А.В., Сорокаты А.Е., Ягудаев Д.М., Трухманов Р.С. [и др.] Фотодинамическая терапия. История создания метода и ее механизмы. *Лазерная медицина*, 2007, т. 11, № 3, с. 42-46. [Geinitz A.V., Sorokaty A.E., Yagudajev D.M., Trukhmanov R.S. Photodynamic therapy. The history and mechanisms of its action. *Lazernaja medicina*, 2007, vol. 11, no. 3, pp. 42-46. (In Russ.)]
3. Узденский А.Б. *Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии*. СПб.: Наука, 2010, 327 с. [Uzdensky A.B. *Cellular and molecular mechanisms of photodynamic therapy*. Saint Petersburg: Nauka, 2010, 327 p. (In Russ.)]
4. Allison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Hu X.H., Childs C.J., Sibata C.H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2004, vol. 1, no. 1, pp. 27-42.
5. Донцов В.И., Крутько В.Н., Мрикаев Б.М., Уханов С.В. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении. *Труды института системного анализа российской академии наук*, 2006, т. 19, с. 50-69. [Dontsov V.I., Krut'ko V.N., Mrikaev B.M., Ukhanov S.V. Reactive oxygen species as a system: significance in physiology, pathology and natural ageing. *Proceedings SAI RAS*, 2006, vol. 19, pp. 50-69. (In Russ.)]
6. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. *Физико-химические основы фотобиологических процессов*. М.: Дрофа, 2006. [Vladimirov Yu.A., Potapenko A.Ya. *Fiziko-khimicheskie osnovy fotobiologicheskikh protsessov: uchebnik dlya vuzov*, Moscow: Drofa, 2006. (In Russ.)]

7. Красновский А.А. Первичные механизмы фотоактивации молекулярного кислорода. История развития и современное состояние исследований (обзор). *Биохимия*, 2007, т. 72, № 10, с. 1311-1329. [Krasnovsky A.A. Primary mechanisms of photoactivation of molecular oxygen. History of development and the modern status of research. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, vol. 72, no. 10, pp. 1065-1080. (In Russ.)]
8. Chen H., Tian J., He W., Guo Z. H₂O₂-activatable and O²-evolving nanoparticles for highly efficient and selective photodynamic therapy against hypoxic tumor cells. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, vol. 137, no. 4, pp. 1539-1547.
9. Price M., Reiners J.J., Santiago A.M., Kessel D. Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*, 2009, vol. 85, no. 5, pp. 1177-1181.
10. Halliwell B. *Biochemistry of oxidative stress*, 2007.
11. Storz G., Tartaglia L.A., Ames B.N. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science*, 1990, vol. 248, no. 4952, pp. 189-194.
12. Rhee S.G. [et al.] Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Molecules and cells*, 2010, vol. 29, no. 6, pp. 539-549.
13. Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Staroverov D.B., Shakhbazov K.S., Terskikh A.V., Lukyanov S. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature methods*, 2006, vol. 3, no. 4, p. 281.
14. Билан Д.С. Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры окислительно-восстановительных процессов в живых системах. *Биоорганическая химия*, 2015, т. 41, № 3, с. 259-274. [Bilan D.S., Lukyanov S.A., Belousov V.V. Genetically encoded fluorescent sensors for redox processes. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2015, vol. 41, no. 3, pp. 231-244. (In Russ.)]
15. Lukyanov K.A., Belousov V.V. Genetically encoded fluorescent redox sensors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2014, vol. 1840, no. 2, pp. 745-756.
16. Фрешни Р.Я. *Культура животных клеток*. Практическое руководство. М.: Бином, 2010, т. 2. [Freshney R.J. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Wiley-Liss, 1987, p. 397.]
17. Шилягина Н.Ю., Плеханов В.И., Шкунов И.В., Шилягин П.А., Дубасова Л.В., Брилкина А.А., Соколова Е.А., Турчин И.В., Балалаева И.В. Светодиодный излучатель для исследования *in vitro* световой активности препаратов для фотодинамической терапии. *Современные технологии в медицине*, 2014, т. 6, № 2. [Shilyagina N.Y., Plekhanov V.I., Shkunov I.V., Shilyagin P.A., Dubasova L.V., Brilkina A.A., Sokolova E.A., Turchin I.V., Balalaeva I.V. LED light source for *in vitro* study of photosensitizing agents for photodynamic therapy. *Modern Technologies in Medicine*, 2014, vol. 6, no. 2. (In Russ.)]
18. Белый Ю.А., Терещенко А.В., Володин П.Л., Каплан М.А. [и др.] Лечение меланом сосудистой оболочки глаза малого размера методом фотодинамической терапии с препаратом фотодитазин. *Российский биотерапевтический журнал*, 2008, т. 7, № 4. [Belyu Yu.A., Tereschenko A.V., Volodin P.L., Kaplan M.A. Photodynamic therapy with photodytazin for the treatment of the small choroidal melanomas. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*, 2008, vol. 7, no. 4. (In Russ.)]
19. Волгин В.Н., Странадко Е.Ф. Изучение фармакокинетики фотодитазина при базально-клеточном раке кожи. *Лазерная медицина*, 2011, т. 15, № 1, с. 33-37. [Volgin V.N., Stranadko Ye.F. Studies of Photoditazin pharmacokinetics in basal-cell skin cancer. *Lazernaja medicina*, 2011, vol. 15, no. 1, pp. 33-37. (In Russ.)]
20. Брилкина А.А., Дубасова Л.В., Балалаева И.В., Орлова А.Г., Сергеева Е.А., Катичев А.Р., Шахова Н.М. Исследование внутриклеточного распределения фотосенсибилизаторов трех типов в опухолевых клетках человека методом лазерной сканирующей микроскопии. *Технологии живых систем*, 2011, т. 8, № 8, с. 32-39. [Brilkina A.A., Dubasova L.V., Balalaeva I.V., Orlova A.G., Sergeeva E.A., Katichev A.R., Shakhova N.M. The study of subcellular distribution of three types of photosensitizers in human cancer cells by laser scanning microscopy. *Technologies of Living Systems*, 2011, vol. 8, no. 8, pp. 32-39. (In Russ.)]
21. 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. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2018, vol. 178, pp. 296-301.
22. DeRosa M.C., Crutchley R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002, vol. 233, pp. 351-371.
23. Yu Z., Sun Q., Pan W., Li N., Tang B. A near-infrared triggered nanophotosensitizer inducing domino effect on mitochondrial reactive oxygen species burst for cancer therapy. *Acs Nano*, 2015, vol. 9, no. 11, pp. 11064-11074.
24. Chernyak B.V., Izyumov D.S., Lyamzaev K.G., Pashkovskaya A.A., Pletjushkina O.Y., Antonenko Y.N., Sakharov D.V., Wirtz K.W.A., Skulachev V.P. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, vol. 1757, pp. 525-534.
25. Zhao H., Xing D., Chen Q. New insights of mitochondria reactive oxygen species generation and cell apoptosis induced by low dose photodynamic therapy. *European Journal of Cancer*, 2011, vol. 47, no. 18, pp. 2750-2761.
26. Luo J., Li L., Zhang Y., Spitz D.R., Buettner G.R., Oberley L.W., Domann F.E. Inactivation of primary antioxidant enzymes in mouse keratinocytes by photodynamically generated singlet oxygen. *Antioxid Redox Signal*, 2006, no. 8, pp. 1307-1314.

REAL-TIME MONITORING OF HYDROGEN PEROXIDE PRODUCTION IN PHOTODYNAMICALLY TREATED CANCER CELLS**Gorokhova A.A., Peskova N. N., Brilkina A.A., Shilyagina N.Y., Balalaeva I.V.**N.I. Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Institute of Biology and Biomedicine
Gagarin ave. 23., Nizhny Novgorod 603950, Russia; e-mail: anastasiya-dosaeva@yandex.ru

Abstract. Hydrogen peroxide plays a dual role in the cell: it participates in the development of free radical oxidation and functions as a signal molecule that takes part in the regulation of a variety of cellular processes. This causes a particular interest to hydrogen peroxide. HyPer is a fluorescent sensor of protein nature, which allows monitoring of the dynamic of intracellular H₂O₂ concentration. We create a stably transfected cell line of human epidermoid carcinoma A431-HyPer. It was experimentally proved that the performed transfection had no significant effect on the resistance of the cells to photodynamic treatment with Fotoditazin[®]. Using the obtained A431-HyPer cell line, a monotonous increase in the H₂O₂ content in the cytoplasm of the cells pre-incubated with Photoditazine was registered for half an hour after irradiation at a dose of 50 J/cm². An increase in the H₂O₂ content for a relatively long time after light irradiation allows to conclude that it produced in the secondary processes developing as a result of photodynamic treatment.

Key words: photodynamic therapy (PDT), hydrogen peroxide, protein sensor HyPer, Fotoditazin.