

Получение клеточных линий, экспрессирующих генетически кодируемый сенсор НуPer в разных компартментах, и их использование при анализе механизмов ответа на фотодинамическое воздействие

Научный руководитель – Балалаева Ирина Владимировна

Горохова А.А.¹, Пескова Н.Н.¹, Соколова Е.А.¹

1 - Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является результатом комбинированного действия трёх нетоксичных компонентов - фотосенсибилизатора, света и кислорода. Активные формы кислорода (АФК) играют ключевую роль в реализации противоопухолевого эффекта фотосенсибилизаторов при ФДТ, запуская окислительные процессы в клетке. Кроме этого, накопилось достаточно данных о сигнальных функциях кислорода, которые осуществляются через АФК. С этой точки зрения, актуальными являются исследования развития окислительного стресса при ФДТ в режиме реального времени.

До недавнего времени изучение продукции АФК в живых системах в режиме реального времени было невозможным, поскольку отсутствовали подходящие методы. Многие проблемы были решены благодаря созданию генетически кодируемых сенсоров на основе флуоресцентных белков. НуPer является первым флуоресцентным генетически кодируемым сенсором белковой природы, который позволяет регистрировать динамику изменения H_2O_2 на уровне целого организма, клетки или отдельного клеточного компартмента.

В рамках работы методом липофекции нами были получены стабильно трансфицированные линии клеток с экспрессией сенсора НуPer в разных клеточных компартментах: митохондриях, ядрах и цитоплазме. Проведено сравнение параметров ростового цикла полученных линий A431-НуPer-Mito, A431-НуPer-Nuc и A431-НуPer-Cyto с таковыми родительской линии A-431 (эпидермоидная карцинома человека).

Определены показатели темновой и световой токсичности в отношении всех линий клеток для фотосенсибилизаторов хлоринового ряда ("Фотодитазин", ООО "Вета-Гранд, Россия) и фталоцианинового ряда ("Фотосенс", ФГУП ГНЦ "НИОПИК", Россия) и показано, что трансфекция не оказала существенного влияния на устойчивость клеток.

С использованием линий A431-НуPer-Cyto и A431-НуPer-Mito показана возможность мониторинга содержания в клетке пероксида водорода в режиме реального времени при фотодинамическом воздействии. Данный подход осуществлен ратиометрическим методом с использованием конфокальной микроскопии.

Планируется, что в дальнейшем с использованием полученных линий будут получены сведения о динамике содержания пероксида водорода в различных компартментах клетки в зависимости от дозы и режима воздействия.

Авторы выражают глубокую признательность своему научному руководителю к.б.н., доц. Балалаевой И.В.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (договор № 14.Z50.31.0022) и РФФИ (проекты 16-04-01676 и 16-34-00772).