

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ИЗМЕРЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ВОДОРОДНОГО ПОКАЗАТЕЛЯ К УСЛОВИЯМ МАКРОСКОПИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ДЛЯ ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК

В. С. Бурдаков^{1,2}, Н. А. Верлов^{1,2}, Ан. А. Богданов², А. А. Богданов²

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина,
Российская Федерация

²ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический) им. Н.П. Напалкова», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Внутриклеточный pH (pHi) играет решающую роль в прогрессировании рака. Раковые клетки демонстрируют обратный градиент pH, характеризующийся внеклеточным ацидозом (низкий pH вне клетки) и внутриклеточным алкалозом (высокий pH внутри клетки). Обратный градиент pH является отличительной чертой метаболизма опухолевых клеток, позволяя им эффективно размножаться и метастазировать. Внутриклеточное подщелачивание достигается посредством различных механизмов, включая повышенную экспрессию и/или активацию переносчиков плазматической мембраны и белков оттока кислоты, которые контролируют гомеостаз pH. Внутриклеточное подщелачивание раковых клеток также связано с метаболической адаптацией, характеризующейся повышенным поглощением глюкозы и питательных веществ, а также выработкой молочной кислоты даже в аэробных условиях (эффектом Варбурга). Считается, что этот метаболический сдвиг является ключевым фактором в развитии и прогрессировании рака [1]. В представленной работе мы оптимизировали процедуру определения внутриклеточного водородного показателя с помощью клеточного красителя cFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidylester). Сам по себе, cFSE не является флуоресцентным, но обладает высокой проницаемостью через мембраны живых клеток, где от него эстеразами отщепляются ацетатные группы, в результате чего, он превращается во флуоресцентный carboxyfluorescein. С помощью автоматического мультифункционального планшетного сканера EnSpireMultilabelPlate Reader (PerkinElmer, США) мы исследовали флуоресцентные свойства соединения, получившегося в результате клеточного метаболизма cFSE (Bd-pharmigen, США). Было установлено, что оно имеет pH-зависимый и pH-независимый режимы флуоресценции при длинах волн возбуждения/эмиссии – 490 нм/520 нм и 440 нм/535 нм, соответственно. Таким образом, расчёт pHi проводили на базе оценки отношения уровней флуоресценции в двух режимах по предварительно построенной калибровочной кривой $pHi=f(I_{490/520}/I_{440/535})$. Для определения pHi прикрепленных к поверхности 96-луночного планшета клеток, снятие сигналов флуоресценции производили в режиме чтения снизу, фокусное расстояние – 3 мм от основания планшета. Для каждого режима возбуждения/эмиссии сигнал снимали в 21 точке лунки, затем, усредняли и, по заранее построенной калибровочной кривой $pHi=f(I_{490/520}/I_{440/535})$, возвращали значение pHi для клеток в этой лунке.

Описанный подход позволил нам наблюдать динамику изменения рН_i при добавлении алкилирующего агента – гидрокарбоната в концентрации 40 мМ, для клеток линии карциномы толстой кишки мыши СТ26WT. Для клеток, культивируемых в нормальных условиях рН среды=7,2, рН_i составил $7,1 \pm 0,2$, при смене среды на содержащую гидрокарбонат с рН=7,8, внутриклеточный рН_i вырос до значений $7,5 \pm 0,3$.

Библиографические ссылки

1. Persi E., Duran-Frigola M., Damaghi M. et al. Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy // Nat. Commun. 2018. Vol. 9, iss. 1. P. 2997.