

ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ С ПЕРЕВИТОЙ ОПУХОЛЬЮ

THE STUDY OF OXIDATIVE STRESS IN INOCULATED LIVER TUMOR CELLS

В. В. Шуплецов, К. Ю. Кандурова, В. В. Дрёмин, Е. В. Потапова

ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет им. И. С. Тургенева»

Шуплецов В. В., Кандурова К. Ю. – студенты кафедры приборостроения,
метрологии и сертификации

Научные руководители: доцент Дрёмин В.В., доцент Потапова Е. В.

Аннотация. В статье описывается метод и устройство для флуоресцентной визуализации опухолевых тканей печени. Основой метода является регистрация изображений индуцированной флуоресценции при использовании зондов *dihydroetidium* и *monochlorbimane* на длинах волн возбуждения 395 и 455 нм. Показаны результаты анализа флуоресценции на срезах печени лабораторных мышей с перевитой опухолью, а также контрольной группы.

На сегодняшний день является актуальным вопрос поиска и внедрения в клиническую практику новых диагностических методов, позволяющих с высокой точностью дифференцировать участки опухолевой инфильтрации. Методы флуоресцентного анализа демонстрируют значительную чувствительность к выявлению наличия патологических изменений в биологических тканях, в частности злокачественных [1]. В частности, интересным является изучение изменения содержания активных форм кислорода (АФК) в клетке, что может приводить к изменению митохондриального мембранного потенциала в результате открытия Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры. Несмотря на то, что окислительный стресс имеет отрицательное значение для всего организма в целом, сегодня выделяют ряд патологий, в развитии которых АФК выступает в качестве одного из пусковых механизмов [2]. В качестве интегральных показателей, вносящих весомый вклад в содержание АФК, возможно оценивать первичный и вторичный маркеры окислительного стресса: супероксиданион, а также восстановленный глутатион. Соответственно, целью данного исследования являлась оценка скорости продукции супероксиданиона, а также содержания восстановленного глутатиона в срезах печени лабораторных мышей.

Экспериментальные исследования проводились в соответствии с принципами GLP. Измерения проводились на лабораторных мышках BDF (C57B16xDBA) с перевитой гепатоцеллюлярной карциномой ($n=2$), а также на условно здоровых мышках в качестве контрольной группы ($n=2$). Всего было получено 12 срезов печени каждой мыши с опухолью, включающих области ткани со злокачественным образованием и условно

здоровую область печени, а также 6 срезов печени каждой мыши контрольной группы.

Оптическая схема установки включала в себя планарный апохроматический объектив Mitutoyo M Plan APO 5X (Thorlabs Inc., США) и двояковыпуклую линзу с фокусным расстоянием 200 мм. Для регистрации изображений использовалась ПЗС камера 340M-USB (Thorlabs Inc., США). Для возбуждения флуоресценции использовались светодиодные источники M395F1 и M455F1 (Thorlabs Inc., США), излучение от которых направлялось на исследуемый объект через объектив при помощи дихроичных светофильтров MD416 и MD480 (Thorlabs Inc., США), соответственно. Для ограничения попадания возбуждающего излучения на матрицу в приёмном канале установки использовались светофильтры FGL455 и FGL495 (Thorlab Inc., США).

Для оценки скорости продукции супероксиданиона регистрировался базовый уровень флуоресценции в течение 3 минут, затем в течение следующих 3 минут регистрировался сигнал после добавления на срез флуоресцентного зонда *dihydroetidium*, который при взаимодействии с супероксиданионом приобретает способность к флуоресценции (максимум поглощения – 500 нм, максимум эмиссии – 590 нм). Для оценки содержания восстановленного глутатиона по уровню флуоресценции срезы предварительно вымачивались с использованием флуоресцентного зонда *monochlorbimane*, который в результате взаимодействия с восстановленным глутатионом также приобретает способность к флуоресценции (максимум поглощения – 394 нм, максимум флуоресценции – 490 нм).

Анализ данных выявил статистически значимую разницу по критерию Манна-Уитни

в опухолевых клетках по сравнению с клетками печени мышей с опухолью и контрольной группой: в скорости производства супероксиданиона – с уровнями значимости $p < 0,05$ и $p < 0,01$; в содержании эндогенного антиоксиданта глутатиона – с уровнем $p < 0,001$.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-02-00669.

Список использованных источников

1. Fluorescence Imaging System for Biological Tissues Diagnosis: Phantom and Animal Studies / V. V. Shupletsov., K. Y. Kandurova, V. V. Dremin et al. // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. 2020. Т. 6. № 1. – С. 210–303.
2. Esteras, N. Mitochondrial hyperpolarization in iPSC-derived neurons from patients of FTDP-17 with 10+16 MAPT mutation leads to oxidative stress and neurodegeneration / N. Esteras, J. D. Rohrer, J. Hardy et al. // Redox biology. 2017. Т. 12. – С. 410–422.