Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

# ДРУЖКОВА ИРИНА НИКОЛАЕВНА

# ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИМИДЖИНГ С ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫМ СЕНСОРОМ SypHer2 В ИССЛЕДОВАНИИ рН ЦИТОЗОЛЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO* И *IN VIVO*

1.5.2 — биофизика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: д.м.н., член-корр. РАН, Загайнова Елена Вадимовна

Нижний Новгород – 2021

# оглавление

Список сокращений	4
Введение	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1 Водородный показатель клетки	10
1.1.1 Понятие водородного показателя и его роль в клетке	
1.1.2 Регуляция внутриклеточного рН	
1.2 Особенности рН опухолевых клеток и тканей	
1.3 Влияние рН опухолевых клеток и тканей на эффективность	
химиотерапии	22
1.4 Способы регистрации внутриклеточного рН	
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
2.1 Объекты исследования	36
2.2 Методы и методики	37
2.3 Схемы экспериментов	
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	52
3.1 Изучение внутриклеточного водородного показателя опух	солевых
клеток in vitro с помощью генетически кодируемого	сенсора
SypHer2	52
3.2 Исследование динамики рН цитозоля опухолевых и стром	альных
клеток (фибробластов) с помощью генетически кодируемого	сенсора
SypHer2 при их взаимодействии in vitro	58
3.3 Изучение pH цитозоля опухолевых клеток in vivo с по	Эмощью
генетически кодируемого сенсора SypHer2	61
3.4 Исследование динамики рН цитозоля опухолевых клеток с по	Эмощью
генетически кодируемого сенсора SypHer2 при воздействии цис	платина
in vitro и in vivo	65
3.5 Исследование динамики рН цитозоля опухолевых клеток с по	Эмощью

генетически кодируемого сенсора SypHer2 при воздействии таксола in	
vitro и in vivo	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	88
выводы	92
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	94

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- **рНс** внутриклеточный рН
- рНе внеклеточный рН
- ПЭТ позитронно-эмиссионная томография
- МРТ магнитно-резонансная томография
- МРС магнитно-резонансная спектроскопия
- GFP Green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок
- АТФ Аденозинтрифосфорная кислота
- **V-АТФаза** Вакуолярная АТФаза
- **РFК-1** фосфофруктокиназа-1
- ЛДГ лактатдегидрогеназа
- **NHE1** Na+/H+ обменник
- МЛУ Множественная лекарственная устойчивость
- ВСЕСГ 2',7'-бис(2-карбоксиэтил)-5(6)-карбоксифлуорисцеин
- **SNARF** Seminaphtharhodafluor
- SPF Specific Pathogen Free, свободный от видоспецифичных патогенов
- huFB Human fibroblasts, фибробласты человека
- **DMEM** Dulbecco's Modified Eagle Medium, среда Игла в модификации Дульбекко
- ИК50 полумаксимальная ингибирующая концентрация
- МТТ жёлтый тетразол
- PBS phosphate buffered saline, натрий-фосфатный буфер
- PI propidium iodide, пропидиум йодид
- FITC Fluorescein, флуоресцеин

#### **ВВЕДЕНИЕ**

#### Актуальность

Известно, что внутриклеточный pH (pHc) опухолевых клеток является более целочным, по сравнению с нормальными клетками организма (7.12-7.65 при норме 6.99-7.2), а внеклеточный pH (pHe) опухоли более кислый (6.2-6.9 при норме 7.3-7.4). Предполагается, что более низкое значение pHe является причиной миграции и инвазии опухолевых клеток, а более щелочное значение pH в цитоплазме опухолевых клеток стимулирует клеточную пролиферацию и препятствует апоптозу.

Более того, эффект множественной лекарственной устойчивости ассоциирован с нарушением градиента pH в опухолевых тканях [1]. Кислый внеклеточный pH может значительно затруднять прохождение препаратов через плазматическую мембрану, что приводит к уменьшению накопления препарата в клетке. Поскольку многие из препаратов представляют собой слабые основания, существует вероятность их прямого протонирования и нейтрализации еще вне клетки в кислой межклеточной среде. Другой механизм хеморезистентности заключается в нарушении градиента pH на мембранах клеточных органелл (лизосом, эндосом, аппарата Гольджи, секреторных везикул), где также может происходить нейтрализация лекарства.

В частности, было показано, что в опухолевых клетках устойчивых к цисплатину, внутриклеточный pH заметно повышен [2-4]. Одним из возможных механизмов защелачивания цитоплазмы клеток, устойчивых к цисплатину, считается повышенная экспрессия вакуолярной АТФазы (V-ATPase). Было показано, что супрессия V-ATPase ведет к быстрому закислению цитоплазмы и существенному увеличению чувствительности к цисплатину *in vitro* [4, 5] и *in vivo* [6].

Однако изучению внутриклеточного pHc уделяется мало внимания, поскольку отсутствуют адекватные методы его измерения. Существующие

методы прижизненного измерения pHc либо инвазивны (например, использование микроэлектродов), либо крайне сложны и дорогостоящи (ПЭТ, МРТ). Поэтому в настоящее время активно развиваются подходы к анализу рН оптическими методами. Их существенным недостатком является необходимость экзогенного введения в клетку или ткань флуоресцентного зонда, чувствительного к рН. Флуоресцентный собой 30НД, как правило, представляет химически синтезированное оптические характеристики вещество, которого сильно меняются при связывании с белками или иными компонентами клетки, а внутриклеточное распределение непостоянно. Использование таких зондов ограничено исследованиями in vitro, поскольку их доставка в клетки солидной опухоли проблематична.

Перспективным инструментом для анализа внутриклеточного pH в опухолях in vivo могут стать генетически кодируемые сенсоры на основе GFP-подобных белков.

### Цель работы:

Изучить внутриклеточный водородный показатель опухолевых клеток при взаимодействии со стромальными клетками, при естественном росте опухоли (*in vivo*) и под влиянием химиотерапевтических препаратов (*in vitro/in vivo*).

#### Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

 Разработать методики регистрации рН в опухолевых клетках in vitro и in vivo с использованием генетически-кодируемого сенсора и систем флуоресцентного имиджинга.

2. Изучить изменение pH цитозоля опухолевых и стромальных клеток при их взаимодействии.

3. Изучить внутриклеточный водородный показатель опухолевых клеток экспериментальных опухолей у животных при естественном росте опухоли.

4. Изучить изменение внутриклеточного водородного показателя опухолевых клеток при воздействии химиотерапевтических препаратов in vitro и in vivo.

#### Научная новизна

Впервые применен новый генетически-кодируемый сенсор для изучения внутриклеточного водородного показателя опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*.

Впервые проведено исследование изменения внутриклеточного водородного показателя при воздействии химиотерапевтических препаратов.

Предложена методика исследования внутриклеточного водородного показателя опухолевых клеток *in vivo*, получены данные о распределении зон с разными значениями внутриклеточного pH, данные сопоставлены с морфологической структурой опухоли. Новизна подтверждена патентом РФ № 2014142436 «Способ регистрации внутриклеточного pH опухолевых клеток».

#### Научно-практическая значимость

Разработанные методики регистрации флуоресценции генетическикодируемого сенсора *in vitro* и *in vivo* могут быть использованы для дальнейших исследований внутриклеточного водородного показателя опухолевых клеток при разработке новых видов противоопухолевого лечения.

Полученные результаты могут стать основой для разработки методов модификации внутриклеточного водородного показателя опухолевых клеток для повышения эффективности стандартной химиотерапии.

Основные выводы и результаты работы могут быть использованы при разработке соответствующих разделов спецкурсов и лекций по биомедицине, онкологии и биофизике.

Работа может иметь практическую ценность для врачей-химиотерапевтов.

#### Основные положения диссертации, выносимые на защиту

 Разработанные методики регистрации внутриклеточного pH на основе генетически кодируемого сенсора SypHer2 и методов оптического имиджинга дают возможность анализировать pHc живых опухолевых клеток в моделях на разных уровнях организации: клеточный монослой и опухолевые сфероиды in vitro и подкожных опухолях in vivo.

7

- 2. Рост опухолевого узла сопровождается зональностью распределения значений pH цитозоля опухолевых клеток in vitro и in vivo.
- 3. Взаимодействие опухолевых и стромальных клеток сопровождается изменениями pHc как в опухолевых клетках, так и в фибробластах.
- Изменения pH цитозоля опухолевых клеток при воздействии химиотерапевтических препаратов зависят от механизма действия препарата и отражают терапевтический эффект.

# Личное участие автора

Личный вклад автора заключался в анализе данных литературы, планировании и выполнении экспериментов, интерпретации полученных результатов, подготовке данных для публикаций и представлении результатов на научных конференциях.

# Апробация работы

Основные результаты и положения диссертации были представлены и обсуждены на Международных конференциях (7 докладов): и Российских конференциях (4 доклада): International symposium "Topical problems of biophotonics – 2013, 2015", VII Съезд Российского фотобиологического общества (пос. Шепси, 2014), Научно-практическая конференция с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к практике» (Москва, 2014), SPIE European conferences on biomedical optics 2015 (Германия, 2015), In vitro and in vivo investigation of pH tumor status using genetically encoded sensors and fluorescence imaging. SPIE. Photonics West 2015 BiOS (San Francisco, United States. 7-12 February 2015), Fluorescent imaging of tumor metabolic state. 3D International Conference on Biophotonics. (Italy, Florence, May 20-22 2015), Tumor and normal cells communication: fluorescence imaging and markers. 10th workshop and conference on advanced multiphoton and fluorescence lifetime imaging techniques FLIM2015 (Germany, Saarbrucken, June 17-19, 2015), Hobbe технологии биоимиджинга и генетически-кодируемые маркеры для онкологии. 68–я ежегодная областная

конференция студентов и аспирантов «Биосистемы: организация, поведение, управление». (Россия, Н. Новгород, 28-29 апреля 2015), ААСК Special Conference on The function of tumor microenvironment in cancer progression (Сан-Диего, США, 7-10 января 2016), 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА» (18-22 апреля 2016).

## Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 109 страницах, включает 2 таблицы и 33 рисунка. Список литературы содержит 192 источников, из них 190 зарубежных.

# Публикации

Всего по материалам диссертации опубликовано 21 научная работа, из них 9 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), определенных ВАК; 11 тезисов конференций; получен 1 патент.

# Конкурсная поддержка

Проведенные исследования поддержаны проектами: РНФ № 14-15-00646 «Исследование энергетического метаболизма опухолевых клеток с помощью генетически кодируемых pH-сенсоров и методов флуоресцентного биоимиджинга»; РНФ № 14-25-00129 «Разработка новейших подходов для изучения механизмов действия противоопухолевых препаратов и раннего ответа опухоли на лечение на основе оптических и молекулярных технологий»; Грант правительства РФ № 11.G34.31.0017 «Флуоресцентные белки: новые подходы к изучению механизмов физиологических и патологических процессов в живых системах».

#### 1.Обзор литературы

#### 1.1 Водородный показатель клетки

#### 1.1.1. Понятие водородного показателя и его роль в клетке

Водородный показатель pH представляет собой десятичный логарифм активности водородных ионов в растворе, взятый с обратным знаком, и выражает его кислотность [7].

# pH = -lg[H]

Это понятие было введено датским биохимиком Сёренсеном (1868-1939 гг.) по первым буквам латинских слов potentia hydrogeni — сила водорода, или pondus hydrogenii — вес водорода. Водородный показатель определяет характер реакции раствора. При pH = 7 ([H] =  $10^{-7}$  моль/л) реакция раствора нейтральна, при pH < 7 ([H] >  $10^{-7}$  моль/л) – кислая, при pH > 7 ([H] < 10-7моль/л) - щелочная [7].

В 70-е годы XX века было установлено, что значение pH в клетке строго фиксировано, у эукариот может в норме изменяться в пределах от 7.0 до 7.4 и я вляется одной из констрант гомеостаза организма. Цитоплазматические pH может регулировать практически все функции в живой клетке [8, 9]. За счет pHчувствительности многих ферментов, pHc определяет основной метаболический путь. Изменения pHc влияют на формирование перекрестных сшивок и полимеризацию элементов цитоскелета (актина и тубулина). Потеря мышечными клетками способности к сокращению (мышечная слабость) также связана с закислением внутриклеточного простарнства [9]. Также внутриклеточный pH регулирует проницаемость мембран за счет влияния на ионоселективные каналы и щелевидные соединения. Кроме того, изменения pHc, связанные с работой Na+/H+- обменника, являются внутриклеточным сигналом регуляции клеточного роста и пролиферации.

Известно, что изменения pHc вляиют на другие внутриклеточные сигнальные пути с участием ионов Ca2+ и циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), что подчеркивает сложность взаимодействий между клеточными сигнальными путями.

Поэтому неудивительно, что клетка имеет несколько уровней регуляции pHc, к которым относятся:

- 1) Буферные системы (бикарбонатная, фосфатная и белковые)
- 2) Системы клеточного транспорта:
  - 1. Н+-АТФаза
  - 2. Катион Н+ обменники
  - 3. Лактат Н+ котранспортер
  - 4. Транспортеры бикарбоната
  - 5. Транспортеры кислот

# 1.1.2. Регуляция внутриклеточного рН

#### Буферная емкость клетки

Общая буферная емкость клетки (βtotal) состоит из буферной емкости цитозоля и буферной емкости гидрокарбоната (Вцитозоль + ВНСОЗ-). Буферная емкость цитозоля (Вцитозоль) обеспечивается за счет внутриклеточных слабых кислот и оснований, включая фосфатные группы, и боковыз цепей аминокислот. Значение констант диссоциации (pKa) большинства ионизируемых групп в клетке значительно выше или ниже нейтрального. В результате βцитозоль сравнительно небольшая при физиологических значениях pH (10-20 мМоль при pH=7.2) и увеличивается при более критических значениях рН (например, 40 мМоль при pH= 6.4). Этот очевидный недостаток компенсирован второй компонентой βtotal – (βHCO3-). буферной емкостью гидрокарбоната Клетки млекопитающих непрерывно подвергаются действию СО2, который не имеет заряда и легко проходит через большинство биологических мембран. Посредством гидратации СО2 и последующей депротонизации угольной кислоты образуется HCO3- эффективный протонный буфер [10, 11]. Общая буферная система клетки быстро и эффективно компенсируют резкие колебания рН однако они не в стостоянии поддерживать равновесное значение рНс в течение длительного времени и компенсировать его выраженные колебания. Для этого существуют системы мембранного транспорта.

#### Системы мембранного транспорта

Протонные АТФазы. В норме внеклеточный рН слега сдвинут в щелочную сторону (7,3-7,4), а цитозоль имеет более кислый рН с постоянной тендецией к закислению. Закисление связано, во-первых, с электрическим мембранным потенциалом, который характеризуется наличием отрицательного заряда на внутренней поверхности мембраны, что ведет к проикновению положительнозаряженных ионов внутрь клетки и выведению отрицательно заряженных ионов (таких как HCO3<sup>-</sup>). Во-вторых, внутри клетки постоянно образуются различные кислотные эквиваленты в результате метаболических реакций (например, производства АТФ в цитоплазме с помощью гликолиза и в митохондриях в реакциях окислительного фосфорилирования) (рисунок 1). Поэтому основные транспорта, участвующие В регуляции внутриклеточного pН системы обеспечивают активное выведение излишков Н+ из клетки. Энергию для транспорта протонов прямым или косвенным образом обеспечивают молекулы ATΦ. АТФазы В Подобные есть плазматической мембране некоторых эпителиальных клеток и остеокластах. Эти клетки снабжены электрогенной АТФазой (V). Париетальные протонной вакуолярного типа клетки И периферические клетки почки дополнительно имеют другой тип АТФазы, которая обменивает К+ на Н+ электронейтральным способом. Хотя АТФазы эффективно выводят протоны из цитозоля, регулирование внутриклеточного рН не является их основной задачей. Таким образом, качающая протоны АТФаза не основной участник в процессе регулирования внутриклеточного рН [10, 11].

Катионно-протонные обменники. Катионно-протонные обменники представляют сосбой гомодимерные комплексы, которые непосредственно переносят Н+ через биологические мембраны, одновременно транспортируя одновалентные катионы, такие как Na+ или K+, в обратном направлении (рисунок 1). Это эволюционно сохранившийся механизм для защиты клетки OT избыточного закисления. У млекопитающих есть, приблизительно, около одиннадцати гомологов щелочных катион-H+ обменников: Na+ – H+ обменник 1 (NHE1; также известный как SlC9A1), NHE9 (также известный как SlC9A9), Na+- H+ антипорт 1 (NHA1; или NHEDC1) и NHA2 (NHEDC2). В клетках катионно-H+-обменники дифференцированно отсортированы не только к определенным подобластям плазматической мембраны, но также и к определенным органоидам вдоль секреторных путей, где они участвуют в огромном числе клеточных процессов [10].

Особая роль в регуляции внутриклеточного pH отводится работе Na+/H+ обменника (NHE1) [12-14], которая не зависит напрямую от гидролиза ATФ, а осуществляется за счет направленного внутрь клетки электрохимического градиента Na+, сгенерированного Na+/K+-ATФазой. NHE-1 осуществляет электронейтральный обмен внутриклеточных протонов H+ на внеклеточные ионы Na+. Приведение в действие Na+ – H+ обменника – процесс электрически нейтральный, стехиометрия которого до сих пор обсуждается (1:1 или 2:2) [15, 16].

Предполагается, что Na+ – H+ обменник состоит из мембранного домена, представленного И большого двенадцатью сегментами, внутреннего цитоплазматического домена (рисунок 1). Показано, что трансмембранные процессы катионного сегменты вовлечены В транспорта, тогда как цитоплазматический регулирует функционирование «хвост» цитоплазматического домена. Удаление «хвоста» приводит к исчезновению ответа на гормональные стимулы и снижает чувствительность антипорта к H+. В дистальных отделах цитоплазматического домена определены места фосфорилирования серина и участки связывания Са2+ - кальмодулинового комплекса, ответственные за активацию обменника.

Одним из наиболее интересных свойств NHE-1 является его регуляция внеклеточными стимулами, такими как гормоны, факторы роста, цитокины и фармакологические агенты [10, 11].

13



Рисунок 1. Механизмы регуляции pH клетки эукариот. Приведено из [10](Casey J.R., Grinstein S., Orlowski J., 2010)

Лактат-H+ котранспортер. Монокарбоксилирующие транспортеры (МСТs) осуществляют симпорт карбоксильных монокислот (в основном лактата) с протонами H+. При протекании в тканях процессов анаэробного метаболизма происходит активное накопление лактата в цитоплазме клетки (рисунок 1). В таких тканях направленный наружу градиент лактата обеспечивает энергию для транспорта протонов H+ во внеклеточное пространство. Известно, что накопление молочной кислоты свойственно только некоторым типам скелетных мышц и солидным опухолям. МСТ не является широко распространенным механизмом регуляции внутриклеточного pH в норме, однако его роль в оаухолевой ткани существенна [10, 11].

*Транспортеры бикарбоната.* В межклеточном пространстве тканей млекопитающих содержится приблизительно 25 мМоль гидрокарбоната HCO3–. Кроме того, у клеток имеется механизм увеличения содержания внеклеточного

гидрокарбоната НСОЗ- для защелачивания цитозоля. Угольная кислота под действием карбоангидраз разлагается на воду и СО2, которые могут выйти из цитозоля и восстановить внеклеточный гидрокарбонат НСО3<sup>-</sup>. Молекула СО2 имеет небольшой размер и электронейтральна, поэтому она способна проникать через биологические мембраны. Однако, известно, что ДЛЯ облегчения прохождения гидрокарбоната НСО3<sup>-</sup> через плазматическую мембрану требуются транспортные белки. Основными среди транспортеров HCO3<sup>-</sup> являются Na+ зависимые HCO3<sup>-</sup> транспортеры (NBC) (рис. 1). Данные транспортеры переносят Na+ и HCO3<sup>-</sup> в одном направлении, но стехиометрия сцепления варьируется. Так, уизоформы 1 электронейтранльного NBC транспортера (NBCn1, известного также как SIC4A7) имеет стехиометрию 1:1. Однако электройнейтральные транспортеры NBCn1 (SlC4A10) и SlC4A9 могут иметь стехиометрию 1 Na +:2 HCO3<sup>-</sup> или 1 Na +:3 НСО3<sup>-</sup>, ствановясь электрогенными [10, 11].

Транспортеры кислот. Хотя постоянное формирование эквивалентов кислот в результате метаболических реакций требует их активного выведения, в клетках имеются и механизмы их импортирования. Наиболее распространенный из них: Cl<sup>-</sup>-HCO3<sup>-</sup> обменник. Данный процесс регулируют два независимых белковых семейства: анионные обменники (AEs; состоявший из AE1 (также известный как SIC4A1) – AE3 (также известный как SIC4A3) и белки SIC26A (группа из пяти Cl<sup>-</sup> -HCO3<sup>-</sup> обменников, электрогенных, так электронейтральных). как И Внутриклеточный Cl<sup>-</sup> градиент (концентрация Cl<sup>-</sup> в цитоплазме, как правило, несколько ниже, чем во внеклеточной среде) обеспечивает движущую силу для переноса НСО3<sup>-</sup> через анионный обменник. Транспорт кислот через СІ<sup>-</sup>-НСО3<sup>-</sup> обменник выполняет четыре основных функции: контроль pH, выведение кислот, выведение оснований и транспорт NaCl. Одновременно подщелачивая и закисляя, обменник работает в двух противоположенных направлениях, что позволяет выровнять значения рН клетки. При защелачивании включается регуляция кислотными эквивалентами [10, 11].

Клетки, специализирующиеся на секреции кислот, такие как остеокласты и париетальные клетки желудка, восприимчивы к цитозольной щелочной

интоксикации (алкалозу). В таких случаях, Cl<sup>-</sup>-HCO3<sup>-</sup> обменник, например AE2, обеспечивает резерв кислот в цитоплазме, что поддерживает в норме уровень внутриклеточного pH и не дает ему достигнуть щелочных значений при активном образовании и выведении кислотных остатков [10, 11].

# 1.2. Обосенности рН опухолевых клеток и тканей

Установлено, что опухолевые клетки имеют более высокий внутриклеточный pH (pHc) – 7,12-7,65 при норме 6,99-7,2 и более низкий внеклеточный pH (pHe) – 6,2-6,9 при норме 7,3-7,4 [10, 11]. В результате на мембране клеток формируется обратный градиент pH ( $\Delta$ pHc/ $\Delta$ pHe), существенно смещенный от электрохимического равновесия протонов, что, в конечном счете, способствует опухолевой прогрессии [17]. Было показано, что обратный градиент pH формируется в самом начале неопластического процесса [18](Reshkin, 2000) и со временем увеличивается [19].

Такой специфический и патологически измененный градиент pH опухолевых клеток и тканей полностью меняет течение термодинамических процессов в клетке на молекулярном уровне, независимо от патофизиологии или генетики происхождения неопластического процесса и в настоящее время рассматривается в качестве определяющей характеристики опухолевых клеток [13, 20, 21].

Первоначально повышенный уровень рНс в опухолевых клетках выглядел парадоксальным, поскольку при высокой скорости пролиферации формируется большое количество метаболических кислот. Однако у опухолевых клеток была установлена повышенная экспрессия и/или активность ионных транспортеров и регуляторов pHc, что ведет к компенсаторному защелачиванию внутриклеточного пространства [22, 23]. В результате недостаточной перфузии плотной опухолевой ткани протоны И молочная кислота накапливаются внеклеточном BO пространстве, приводя к формированию кислого внеклеточного микроокружения и меняя рН градиент (рисунок 2) [23]. Кроме того, в исследованиях, посвященных мышечным клеткам, находящимся в условиях интенсивной работы, было показано, что закисление цитоплазмы происходит в ситуации, когда гидролиз

АТФ в цитоплазме превышает скорость образования АТФ митохондриями, а также когда достигнута максимальная нагрузка на имеющуюся лактат-протонную помпу, выводящую H+ из клетки [24].

На сегодняшний день установлено несколько ключевых функциональных признаков опухолевых клеток, к которым, в частности относятся: аэробный гликолиз в качестве преобладающего метаболического процесса, активная пролиферация; уход от апоптоза; способность клеток к миграции и метастазированию [25]. Показано, что не последнюю роль в развитии этих признаков играет внутриклеточный рН.



Рисунок 2. Адаптация опухолевого микроокружения к повышенному выведению кислот. Приведено из [17].

# Внутриклеточный рН и метаболическая адаптация

Метаболический сдвиг в сторону преобладания анаэробного гликолиза и снижение окислительного фосфорилирования, часто описываемые как «Эффект Варбурга», является наиболее характерной чертой большинства опухолей и активно пролиферирующих клеток. Подобные метаболические изменения дают преимущество опухолевым клеткам, повышая их устойчивость к гипоксии, снабжая мономерами сложных биологических молекул, необходимыми для образования новых клеток [26]. Повышенные потребление глюкозы и продукция

молочной кислоты показаны для многих опухолей. При щелочном рНс гликолитический поток возрастает [27-30], что объясняется рН-зависимостью гликолитических ферментов [17, 31], активности некоторых включая (PFK-1), лактадегидрогенезу фосфофруктокиназу-1 хотя И многие экспериментальные данные по-прежнему противоречивы.

У высоко агрессивных метастазирующих опухолей было отмечено увеличение экспрессии или активности лактадегидрогенезы (ЛДГ), фермента гликолиза, превращающего пируват в лактат, супрессия которого тормозила опухоли [32-34]. Было показано скорость роста снижение процесса посттрансляционного ацетилирования Lys5 в ЛДГ, ведущее к снижению активности ЛДГ, в опухолях поджелудочной железы, и, как следствие, снижение роста опухоли при замене эндогенной ЛДГ ацетилированной формой [35]. Посттрансляционное протонирование/депротонирование также регулирует активность ЛДГ, которая увеличивается при физиологическом повышении рНс [36]. С помощью программного обеспечения pHcnder [37] в молекуле ЛДГ были установлены два потенциально рН-чувствительных участка, в которых значения рКа остатков аминокислот могут сдвигаться в физиологических значениях рН. Первый участок содержит Asp140 (расчетный рКа~7,4, рКа раствора 3,9), который образует электростатическую связь с углеродом His192 в каталитическом участке. Второй потенциально рН-чувствительный участок содержит гидрофильный Lys131 (расчетный рКа~7,9, рКа раствора 10,5), и комбинацию остатков, расположенных на поверхности тетрамера - Arg170, His180 и His185 [21]. Однако механизм рН-чувствительности ЛДГ еще предстоит выяснить.

Хотя повышенное содержание лактата установлено для активно пролиферирующих раковых клеток, механизмы преобразования углерода при метаболизме глюкозы остаются не до конца установленными. Известна pHзависимость активности PFK-1, первого фермента гликозолиза, влияющего на его скорость, при этом в диапазоне pH 7,0-7,4, активность фермента меняется более чем в 10 раз [38-40]. Однако имеющиеся литературные данные говорят о неоднозначной роли PFK-1 в неопластическом процессе. Во многих типах рака установлена повышенная экспрессия белка PFK-1, подтверждая роль высокой активности PFK-1 в обеспечении опухолевого фенотипа [41]. В то же время в опухолевых клетках наблюдается и повышенный уровень гликозилирования PFK-1, ингибирующего ферментативную активность [42]. Также в некоторых опухолях человека обнаружены соматические мутации, блокирующие ферментативную активность PFK-1 [43]. Как и в случае с ЛДГ, молекулярный механизм pHзависимости активности PFK-1 еще предстоит установить. Так, по результатам анализа кристаллической структуры тромбоцитарной изоформы PFK-1, рассчета рКа и моделирования молекулярной динамики His208 был установлен в качестве возможного pH-чувствительного остатка. His208 имеет повышенную pKa и является консервативным остатком во всех трех изоформах PFK-1 (печеночной, тромбоцитарной). His208 И располагается на дне субстратмышечной связывающего центра фруктозо-6-фосфата (Ф6Ф) и при протонировании при низких значения pHc может разрушать центр связывания, снижая активность связывания Ф6Ф [44]. Кроме того, показано, что при повышении рНс увеличивается экспрессия фосфофруктокиназы-2 (ФФК-2), генерирующей фруктозо-2,6-бисфосфат аллостерический активатор PFK-1 [45]. Таким образом, уже имеющиеся данные о pH-зависимости активности ферментов начального (PFK-1 и Ф6Ф) и конечного (ЛДГ) этапов гликолиза, а также дальнейшие исследования рН-зависимых механизмов в опухолевых клетках открывают перспективу для разработки терапевтических подходов, направленных на подавление метаболического репрограммирования опухолевых клеток И, следовательно, опухолевого роста.

#### Внутриклеточный рН и клеточная инвазия

Многочисленные данные показывают, что повышенный pHc необходим для направленной миграции клеток, в том числе, для моделирования актиновых филаментов и клеточной адгезии [46-50]. Сниженный pHe обеспечивает клеточную миграцию [51, 52] и инвазию [53] частично за счет активации металлопротеиназ (MMPs), растворяющих клеточный субстар [54, 55]. Показано,

что активация NHE1 ведет к закислению внеклеточного пространства и последующей деградации матрикса [56], также влияет на экспрессию MMPs и их локализацию [45, 57]. Было показано, что повышение pHc в результате активации ионных транспортеров обеспечивает миграцию клеток молочной железы с трансформированными онкогенами [58], клеток глиомы, выделенных из опухолей пациентов [59] и клеток рака шейки матки, не имеющих признаков метаболической адаптации [60]. Также была показана связь повышенного pHc в результате активации ионных транспортеров и инвазивного фенотипа клеток [57, 61].

В процессе клеточной миграции динамические изменения pHc регулируют ремоделирование цитоскелета и процессы фокальной адгезии, при этом с pHc снижается стабильность фокальной адгезии [62] увеличением И увеличивается общая скорость клеточной миграции [46]. Важно, что снижение рНс и увеличение рНе ведет к ингибированию клеточной миграции [47, 49, 59, 63]. С помощью ЯМР, биохимических и молекулярно-динамических методов молекулярные неоднократно были продемонстрированы основы влияния повышенного рНс на увеличение активности факторов обмена гуаниновых нуклеотидов при формировании клеточной полярности [64], кофилина при полимеризации актина и формировании мембранных протрузий [47, 65, 66], связывания талина с актиновыми филаментами при ремоделировании фокальной адгезии [62, 67]. Для данных белков установлены механизмы рН-регуляции: деполяризация His остатков при высоких значениях pHc, что снижает их связывающую способность отношении отрицательно заряженных В фосфатидилиназитолфосфатов В клеточной мембране аллостерическое И регулирование конформационных изменений.

Также была продемонстрирована pH-регуляция киназы фокальной адгезии (FAK), для активации которой необходимо депротонирование кислотного остатка His58, происходящее при pH выше 7,4 [68]. Поскольку была установлена роль FAK в опухолевой прогрессии [69], селективное поддержание His58 в

20

протонированной форме может рассматриваться в качестве перспективного терапевтического подхода.

Важно отметить, что связь постоянно повышенного уровня pHc с миграционной активностью была неоднократно продемонстрирована как для опухолевых клеточных линий [57, 59, 63, 70, 71], так и для опухолевых моделей у животных [61]. В данных исследованиях также было показано, что снижение pHc ведет к ингибированию миграционного и инвазивного фенотипа. Это дает возможность предположить, что снижение pHc опухолевых клеток при терапии может вести к снижению метастазирования.

# Внутриклеточный рН и клеточная пролиферация

Влияние внутриклеточного рН на клеточную пролиферацию неоднократно продемонстрированно экспериментах [72]. В Предполагается, pHc что активизирует клеточную пролиферацию посредством множественных механизмов [73-76]. Установлено, что при pHc > 7,2 клетки с большей скоростью входят в Sфазу под влиянием факторов роста [51] и ускоряется переход/прохождение фазы G2/M [77]. При pHc  $\leq$  7,2 наблюдается отложенный переход в фазу G2/M из-за снижения активности ключевого комплекса, регулирующего митотическое деление – циклинзависимая киназа 1 (CDK1)-циклин B1, частично, за счет существенного ингибирования фосфорилирования CDK1 по Tyr15 и снижения экспрессии циклина В1 [77].

По всей видимости, регуляция активности CDK1-циклин B1 является консервативным механизмом регуляции начала митоза и мейоза. Так, в яйцеклетках беспозвоночных кратковременное повышение pHc ведет к повышению активности CDK1 и является необходимым для реинициации мейоза и созревания яйцеклеток, перекрывая даже супрессорное действие MAPKs в этих клетках [78, 79]. Кроме того, повышенный pHc подавляет митотический арест, вызванный повреждением ДНК [80-82]. Таким образом, создавая адаптивные преимущества при прохождении контрольных точек клеточного цикла, постоянно

повышенный рНс раковых клеток способствует не только неограниченной пролиферации, но и генетической нестабильности [83].

# Внутриклеточный рН и уход от апоптоза

Стабильный повышенный рНс опухолевых клеток существенно повышает устойчивость к апоптозу. Известно, что pHc < 7,2 является консервативной чертой клеток, подвергающихся апоптозу, и может быть ранним фактором, запускающим этот процесс [84, 85]. Хотя полного понимая регулирования апоптоза pHчувствительными молекулами на сегодняшний день нет, существует предположение, что изменение pH ведет к синхронным изменениям нескольких белков, участвующих в этом процессе. Так, например, кислый рН запускает конформационные изменения проапоптотического белка ВАХ, активируя его встраивание в наружную мембрану митохондрий с последующим образованием пор [86]. Образование пор приводит к выходу цитохрома с и других проапоптотических белков в цитозоль. Кроме того, цитохром с-опосредованная активация каспаз наиболее эффективна при рНс ~ 6,8 [85]. Поскольку митохондриальный путь активации апоптоза рассматривают в качестве одного из терапевтических подходов к лечению рака, выявление ключевых pHчувствительных регуляторов этого процесса может способствовать разработке более эффективных препаратов, направленных на регуляцию рН-чувствительных процессов.

# **1.3 Влияние рН опухолевых клеток и тканей на эффективность** химиотерапии

Одной из основных проблем при лечении онкологических заболеваний является множественная лекарственная устойчивость (МЛУ). Термин обозначает способность формировать устойчивость сразу к нескольким препаратом, независимо от механизма их действия [87]. Данное понятие впервые было введено при исследовании возникновения резистентности бактерий к определенным антибиотикам, позднее наличие схожих механизмов было обнаружено и при других заболеваниях, включая рак. Часть механизмов являются специфическими для конкретного заболевания, другие, например, усиленное выведение

препаратов, являются эволюционно-консервативными и встречаются, как у микроорганизмов, так и у раковых клеток человека. Примечательно, что изначально чувствительные к лекарственному воздействию раковые клетки способны довольно быстро развивать устойчивость [88].

Резистентность может развиваться как за счет биохимических факторов, так и за счет влияния микроопухолевого окружения. Биохимическая устойчивость может определяться активацией транспортных систем выведения препаратов или метаболических путей. Физиологическая же устойчивость является следствием недостаточной перфузии, гипоксии и/или кислой опухолевой среды и других факторов [89]. Обратный градиент рН также рассматривается в качестве одного из механизмов, опосредующих МЛУ [1, 87, 90].

Как уже было отмечено ранее, повышенный рНс рассматривается в качестве механизма предотвращения апоптоза [84, 85]. Кроме того, показано, что повышенный рНс сопряжен с устойчивостью опухолевых клеток к цисплатину – одному из наиболее распространенных химиопрепаратов [2, 3]. В качестве одного из возможных механизмов повышения pHc в клетках устойчивых к цисплатину V-АТФазы. рассматривается оверэкспрессия вакуолярной помпы \_ Предполагается, что повышенный pHc стимулирует образование электронейтральной формы препарата, которая легче проникает внутрь клетки и выходит из нее, снижая связывание препарата с ДНК. Наиболее же изучен процесс влияния обратного гарадиента рН на проникновение препаратов внутрь опухолевой клетки [1, 89, 91-93]. Известно, что химиопрепараты являются либо слабыми кислотами, либо слабыми основаниями (таблица 1).

При диссоциации слабых кислот образуется анион и протон (АН↔А-+ H+) с преобладанием протонированной формы препарата. И, наоборот, слабые основания ионизируются в растворе с образованием протонированной формы (В + H+ ↔ BH+) с преобладанием незаряженной формы препарата [91]. Обычно нейтральные формы препаратов проникают через клеточную мембрану легче, чем заряженные формы. Это приводит к появлению феномена, называемого «захват

ионов», при котором слабые основания депонируются в компартментах с кислым уровнем pH, а слабые кислоты – в щелочных компартментах (рисунок 3).

# Таблица 1

Физиологические значения рКа для основных химиотерапевтических

Слабая кислота		Слабое основа	Слабое основание		
препарат	рКа	препарат	рКа		
5-фторурацил	7,76 <sup>1</sup>	даунорубицин	8, 46 <sup>1</sup>		
циклофосфамид	6,0 <sup>1</sup>	доксорубицин	8,34 <sup>1</sup>		
хлорамбуцил	5,8 <sup>1</sup>	митоксантрон	8,13 <sup>1</sup>		
цисплатин	5,06 <sup>3</sup>	блеомицин	7,4 <sup>2</sup>		
		эпирубицин	8,08 <sup>2</sup>		
		Алкалоид винка	7,4-8,8 <sup>2</sup>		
пакситасел	Цвитер-ион <sup>1</sup>				
ссылки	<sup>1</sup> [89]Mahoney, 2003				
	<sup>2</sup> [91]Raghunand 2000				
	<sup>3</sup> [93]Alfarouk, 2015				

препаратов – слабых кислот и слабых оснований

Таким препаратов-слабых образом, случае оснований, заряженная В протонированая форма препарата плохо проникает через плазматическую мембрану, что приводит к преимущественному накоплению препарата в межклеточной среде с более кислым значением рН. В случае препаратов-слабых кислот наблюдается беспрепятственное проникновение незаряженной формы препарата внутрь клетки, где, в более щелочных условиях, происходит диссоциация препарата на отрицательно заряженный анион и протон, что приводит к преимущественному накоплению препарата в цитоплазме опухолевых клеток. В итоге, кислое межклеточное пространство опухоли выступает в качестве барьера для проникновения препаратов-слабых оснований внутрь клетки [91].



Рисунок 3. Особенности распределения лекарственных препаратов в опухолевой ткани под влиянием градиента рН. Приведено из [91].

При проникновении же в клетки нейтральных гидрофобных препаратов – слабых оснований, подключается другой адаптивный механизм – «лизосомальное депонирование» препаратов, основанный на разнице pH цитоплазмы и pH лизосом [94]. Нейтральные формы препаратов проникают из цитоплазмы в лизосомы и там протонируются, что затрудняет их обратный транспорт и связывание с молекулами-мишенями. В результате цитотоксический эффект препаратов снижается в сотни раз [95, 96]. Подобное «лизосомальное депонирование» было продемонстрировано в отношении сунитиниба (SU11248, Sutent), доксорубицина (DOX, adriamycin), даунорубицина (DNR, cerubidine), винкристина (oncovin), митоксантрона (novantrone) и др. [96-103].

Говоря о роли pH градиента на границе цитоплазмы и лизосом в «лизосомальном депонировании», следует отметить, что pH лизисом в некоторых опухолевых клетках существенно выше (т.е. менее кислый), чем в нормальных клетках, в то время как, физиологичный pH лизосом составляет около 5. Для лизосом клеток рака молочной железы MCF-7 было установлено, что он равен 5,8 [104, 105], а для клеток промиелоцитарной лейкимии HL-60 - порядка 6,4 [106]. Интересно, что у обеих линий наблюдалось восстановление значений pH до типичныйхкислых значений при развитии резистентности к доксорубицину [104-106]. Также было показано, что «лизосомальное депонирование» сунитиниба в высокой степени зависит от градиента pH на границе цитоплазмы и лизосом, препарат подвергался депонированию только в случае неопластической трансформации клеток с соответствующим изменением их цитоплазматического pH [103].

Кроме того, внутриклеточный рН может влиять на взаимодействие препаратов с их мишенями: различными внутриклеточными органеллами, ДНК, РНК и белками, участвующими в клеточном цикле, передаче сигналов и развитии апоптоза [11]. В таблице 2 приведены данные об активности некоторых распространенных химиотерапевтических препаратов при кислых (< 7.0).нейтральных (7,0 – 7,4) и щелочных (>7,4) значениях рН с указанием литературных источников. Видно, что, например, препараты алкилирующего действия, типа циклофосфамида и его производные мелфалан, хлорамбуцил, более активны при кислых значения рН [89, 107, 108]. Циклофосфамид является пролекартсвом и кислая среда форсирует его биоактивацию. С другой стороны, активность ифосфамида – аналога циклофосфамида не усиливается в кислом [107]. Таким образом, было сделано заключение, окружении что бисхлорэтиламинная группа является ключевой для обеспечения протон-зависимой активации данной группы препаратов [107].

Было установлено увеличение цитотоксичности алкилирующих агентов триэтиленамина и тиофосфамида при закислении трансплантированных

26

# Таблица 2

#### Активность основных химиотерапевтических препаратов в разных

Препарат		Ссылка		
	< 7,0	7,0-7,4	> 7,4	
Циклофосфамид	++	+		Mahoney, 2003
				Jahde, 1989
Мелфалан	++	+		Jahde, 1989
				Skarsgard, 1992
Хлорамбуцил	++	-		Mahoney, 2003
				Jahde, 1989
				Skarsgard, 1992
Ифосфамид	+	+		Jahde, 1989
триэтиленмеламин	++	+		Connors, 1964
Тиофосфамид	++	+		Oskinsky, 1987
Метотрексат	+	+	+	Hahn, 1983
5-фторурацил	++	+		Mahoney, 2003
Блеомицин	+	+	+	Hahn, 1986
				Hahn, 1983
				Urano, 1988
Митомицин С	++	+		Kennedy, 1985
Амфотерицин В	+	+	+	Wike-Hooley,
				1984
				Hahn, 1986
				Hahn, 1983
Доксорубицин	+	++		Mahoney, 2003
				Urano, 1988
Митоксантрон	+	++		Mahoney, 2003
Винбластин	+	++		Ferguson, 1984
Цисплатин	+++	+		Teicher, 1989
Паклитаксел	+	++		Mahoney, 2003

диапазонах рН

крысиных опухолей посредством гипергликемии [109, 110]. С другой стороны, эффективного эффект метотрексата \_ антиметаболита, В отношении определенных видов рака, не зависел от pH в исследованиях in vitro. 5фторурацил относится к пролекарствам, приобретающим свойства антиметаболита при внутриклеточной модификации, является слабой кислотой. Следовательно, кислый рН вдет к увеличению его поступления в клетку и большей эффективности [89]. Митомицин С, блеомицин, амфотерицин В и доксорубицин – противоопухолевые препарата природного происхождения. Было небольшое увеличение цитотоксичности С показано митомицина \_ биоразлагаемого алкилирующего агента, при снижении рН [111]. Это увеличение

активности связывают с повышенным образованием сшивок в ДНК при кислых условиях среды. Цитотоксичность блеомицина [112-114] и амфотерицина В [112, 113, 115] не менялась в зависимости от кислотности среды, а токсичность [89. доксорубицина снижалась при кислых условиях 114]. В составе доксорубицина имеется первичный амин с основным рКа, следовательно, его транспорт в кислой среде может быть затруднен. Так, поглощение доксорубицина при рН клеточного окружения около 6,6 было вдвое меньше, чем при рН равным 7,4 [89, 114]. Винбластин и винкристин также препараты природного происхождения с рКа 5,0-5,5 и 7,4 при физиологичных значениях рН, соответственно. Транспорт этих алкалоидов в клетку также снижается при кислом окружении [116].

Часто апоптоз опухолевых клеток связывают с закислением действием внутриклеточного пространства, вызванным определенных препаратов. Так, Hirpara с соавторами показали в своих исследованиях, что воздействие химиотерапевтических препаратов приводит к образованию пероксида водорода в митохондриях, который ингибирует NHE1, приводя к закислению внутриклеточного пространства [117]. В свою очередь, кислая среда приводит к рекрутированию митохондриями Вах, выходу из митохондрий цитохрома с с последующим активированием каспазного каскада, ведущим к апоптозу [117, 118]. И, наконец, паклитаксел – один из таксанов, выделяемых из тисового дерева, крайне липофильное соединение, лишенное ионизируемых групп со значением рКа, лежащим в физиологических пределах. Поглощение препарата не зависит от рНе [89].

Как видно, эффективность многих, хотя и не всех препаратов, зависит от уровня pH. Большинство данных получено при изучении влияния именно водородного показателя межклеточного пространства, а не внутриклеточной среды, что связано, в частности, с трудностями неинвазивной регистрации pH именно внутри клетки.

28

# 1.4 Способы регистрации внутриклеточного рН

Исторически первым методом регистрации уровня внутриклеточного pH стал инвазивный метод исследования с помощью двух наноэлектродов – рабочего электрода из ZnO и электрода сравнения из Ag/AgCl. Рабочий электрод представлял собой массив наностержней оксида цинка с гексагональным сечением, выращенных на кончике стеклянного капилляра. Разность потенциалов между электродами линейно зависит от pH в интервале 4 -11 (рисунок 4). Данный метод является технически очень сложным (требует определенных навыков от исследователя) и инвазивным, что является его главным недостатком, поскольку позволяет совершать однократное измерение с последующей гибелью клетки и, соответственно, не позволяет вести динамических наблюдений [119].



Рисунок 4. Метод регистрации значения рН с помощью наноэлектродов Приведено из [119].)

#### Неоптические методы

К неоптическим методам регистрации pHc относятся позитронноэмиссионная томография (ПЭТ), магнитно-резонансная спектроскопия (МРС) и магнитно-резонансная томография (МРТ).

В основе **ПЭТ** лежит возможность детектировать радиоактивно-меченные биологически активные соединения с помощью специального оборудования (ПЭТ-сканера). С 1970-х годов применяется данный метод с использованием радиоактивно-меченого диметадиона, способного распределяться вдоль градиента pH, возникающего на границе полупроницаемой мембраны. Однако метод показал себя недостаточно чувствительным и точным, поскольку распределение диметадиона зависит от градиента pH на мембране и парциального объема внутри- и внеклеточного пространства, которые остаются неизвестными [120]. В настоящее время для измерения pH методом ПЭТ используют соединение пептидной природы 64Cu-DOTA-pHLIP, которое накапливается в среде с пониженным уровнем pH. С помощью данного соединения Vavere A.L. с соавторами показал кислые значения внеклеточного pH опухоли простаты с использованием 64Cu конъюгированные с pHLIP [121]. Однако это касается измерения внеклеточного pH, а не pH внутри клетки.

Методы на основе магнитного резонанса (МРТ и МРС) базируются на измерении электромагнитного отклика ядер атомов водорода на возбуждение их определённой комбинацией электромагнитных волн в постоянном магнитном поле высокой напряжённости. Для измерения рН используется регистрация разницы химических сдвигов между рН – зависимыми и рН – независимыми резонансами [120, 122].

При помощи MPC удалось раздельно измерить внутриклеточный и внеклеточный pH. С помощью агента 2 - имидазола - 1- ил -3-этоксикарбонил пропионовой кислоты (IEPA) было показано, что значения pH в разных участках опухоли отличаются. Низкомолекулярные агенты для регистрации значения pH методом MPC применили в своих работах Sherry с соавторами и Zhang с соавторами. Они синтезировали pH-зонды на основе гадолиния с pH-зависимой релаксацией. Для расчетов значения pH при использовании MPT необходима точная информация о концентрации агента в каждой точке изображения (вокселе). Raghunand использовал последовательную инъекцию двух Gd – агентов, один из которых был нечувствителен к pH. Таким способом были зафиксированы значения pH в почках и глиомах головного мозга у крыс. При этом расчет значения pH производился путем наложения изображений и расчета концентрации первого агента относительно второго [120, 123, 124].

Работы, основанные на ядерно-магнитной визуализации рН, представлены наиболее широко на сегодняшний день. При этом эксперименты проводят как с применением какого-либо одного метода, так и их комбинации (МРТ+ПЭТ, MPT+MPC). Однако данные методы имеют ряд недостатков: низкое пространственное и временное разрешение; необходимость использования вспомогательных агентов (в том числе токсичных и радиоактивных); временная отсрочка между введением агента и регистрацией значения рН; сложный метод обработки получаемых данных; высокая стоимость оборудования и материалов [120].

#### Оптические методы.

Методы оптической визуализации основаны на излучении длинноволновой части видимого диапазона спектра и ближнего инфракрасного диапазона, которое является неивазивным вследствие малой энергии кванта света и незначительной мощности. Оптический имиджинг – это быстрый, точный и относительно недорогой метод визуализации [125].

Первые исследования методами оптического имиджинга проводили с помощью химических индикаторов или зондов, чувствительных к изменениям определенных параметров, в частности рН. Одним из наиболее часто используемых химических индикаторов является 2',7'-бис(2-карбоксиэтил)-5(6)карбоксифлуорисцеин (BCECF) и его гомологи [126]. Он позволяет проводить измерения в диапазоне 6.5 - 7.5 единиц рН. Одним из преимуществ этого индикатора является его рациометрический сигнал: для измерения pH определяют отношение интенсивностей флуоресценции, испускаемой при 535 нм, при возбуждении светом длины волны 503 нм и 439 нм. Это позволяет количественно измерять pH независимо от концентрации индикатора в клетке. BCECF равномерно распределяется по клетке и относительно медленно "вымывается", его сигнал не зависит от ионной силы. Кроме того, BCECF существует также в форме нефлуоресцирующего ацетоксиметилового эфира, что позволяет ему проникать в клетку, где он гидролизуется с выделением флуоресцентного индикатора; при этом, впрочем, также выделяются вредные для клетки вещества – метанол и уксусная кислота. Кроме того, BCECF может ингибировать Ca2+-АТФазу цитоплазматической мембраны - одного из возможных участников изменения клеточного pH [127].

Другой распространённый индикатор - карбокси-SNARF 1 [126, 128]. Спектр эмиссии SNARF значительно изменяется с pH: в протонированной форме они испускают флуоресценцию при 580 нм, в то время как в щелочной среде максимум миссии флуоресценции наблюдается при 640 нм. Это позволяет, как и в случае BCECF, измерять рациометрический сигнал индикатора. Кроме того, этот индикатор также существует в форме ацетоксиметилового эфира. SNARF относительно устойчив к фотоинактивации и долго задерживается в клетках [129]. Наконец, красная флуоресценция индикатора позволяет использовать его совместно с другими, например, индикаторами кальция, а также уменьшает воздействие облучения на клетки. Тем не менее, у SNARF также есть недостатки. В частности, интенсивность флуоресценции SNARF меняется в зависимости от его окружения в клетках [128].

Таким образом, основными недостатками экзогенных химических индикаторов являются: проблемы при их доставки внутрь клетки, токсическое влияние на клетки, влияние непосредственно на уровень внутриклеточного pH и их довольно быстрая элиминация из клетки [130]. Вкупе эти недостатки осложняют процесс мониторинга и делают невозможными длительные наблюдения одних и тех же клеток в динамике.

Данные проблемы могут быть решены за счет применения генетически кодируемых сенсоров. Генетически кодируемые флуоресцентные индикаторы созданы на основе зелёного флуоресцентного белка медузы Aequorea victo-ria (GFP) [131] или красного флуоресцентного белка из коралла Discosoma sp. (dsRed) [132]. Структурно GFP представляет из себя β-бочонок, внутри которого остатки серина, тирозина и глицина способны самопроизвольно вступать в реакцию циклизации с образованием хромофора. Аминокислотные остатки, формирующие окружение хромофора, выступают в роли доноров и акцепторов протонов и определяют флуоресцентные свойства GFP (Рисунок 5). Некоторые генетически модифицированные варианты GFP изменяют свои флуоресцентные свойства в пределах физиологических значений pH. Один из таких вариантов - superecliptic pHluorin - увеличивает интенсивность флуоресценции, возбуждаемой при 475 нм, при переходе от кислотных к щелочным значениям рН с рКа 7,1 [133]. Существует также красный флуоресцентный pH индикатор - pHTomato [134], также увеличивающий интенсивность флуоресценции при защелачивании среды и обладающий рКа 7,8. Это позволяет использовать его совместно с многими другими индикаторами, обладающими флуоресценцией в зелёной части спектра, каких большинство.

Однако существенным недостатком описанных индикаторов с точки измерения внутриклеточного pH является измерение на основе изменения интенсивности флуоресценции индикатора, а не отношения интенсивностей как в случае SNARF и BCECF. Это означает, что изменение концентрации белка в клетке, а также фотоинактивация будут существенно влиять на показания индикатора.

Эти недостатки позволяет компенсировать использование рациометрических сенсоров. Первым рациометрическим сенсором на pH был RaGFP с двумя пиками возбуждения флуоресценции на 475 нм и 395 нм. С его помощью были показаны отличия значений pH в разных клеточных компартментах.

33



Рисунок 5. Пространственная структура и строение хромофора GFP. Указаны аминокислотные остатки, принимающие участие в протонировании/депротонировании хромофора. Приведено из [135].

Позднее были разработаны генетически кодируемые сенсоры deGFPs, при помощи которых наблюдали за изменением значения pH в нейронах E2GFP, измеряли значение pH внутри везикулы в режиме реального времени. GFpH показал значения pH лейкоцитов при лейкозе *in vivo*. Tantama M. с соавт. открыли первый красный белковый pH сенсор - pHRed, работу которого показали на нейробластомы Neuro-2a. Также Poëa-Guyon S. клетках соавторами С продемонстрировали на эозинофильных клетках крысы РС12 визуализацию значения pH при помощи сенсора CgA-ECFP. Преимущество рациометрических сенсоров в том, что их показания не зависят от экспрессии гена белка в клетке, фотоинактивации и оптической длины пути [130, 136, 137].

В 2006 в Лаборатории молекулярных технологий ИБХ РАН был создан первый генетически кодируемый сенсор НуРег для детекции внутриклеточного пероксида водорода H2O2. Сенсор представляет собой химерный белок, состоящий из двух доменов: чувствительного к H2O2 и флуоресцентного. Данный белок обладает комбинированной чувствительностью и к H2O2 и к pH. Затем, в 2011 году в Швейцарии, в университете Женевы, сенсор HyPer был модифицирован путем направленного мутагенеза, а именно заменой первого цистеина на серин (мутация C199S), с получением нового сенсора, названного SypHer, обладающего чувствительностью только к pH. Новый сенсор был использован для исследования уровня pH в митохондриях при повышении концентрации ионов Ca2+ в цитоплазме [138, 139].

Тогда же в 2011 году группой В.В. Белоусова в ИБХ РАН был разработан улучшенный генетически кодируемый сенсор комбинированного действия для детекции H2O2 и уровня pH, названный HyPer-2, динамический диапазон которого в 2 раза превышает динамический диапазон сенсора HyPer. Затем на его основе получен сенсор SypHer-2. Высокая интенсивность флуоресценции данного сенсора дает преимущества не только для исследований *in vitro*, но и *in vivo*, поскольку открывает возможность регистрации сигнала в плотных тканях животных [140].

# Глава 2

# Материалы и методы

#### 2.1 Объекты исследования

#### Клеточные культуры

Клетки аденокарциномы шейки матки человека Hela Kyoto, трасфецированные геном флуоресцентного белка-сенсора, чувствительного к изменению pH - SypHer2. Культуры были получены в рамках совместных проектов в лаборатории Белоусова В.В. в Институте биоорганической химии РАН, г. Москва. Клетки нормальных фибробластов человека (huFB) были любезно предоставлены институтом биологии развития РАН.

#### Лабораторные животные

Эксперименты выполнены на самках мышей линии nude, массой 20-22 г. Животных приобретали в НПП "Питомник лабораторных животных" ФИБХ РАН (г. Пущино). Иммунодефицитные мыши содержались в SPF виварии в условиях повышенного контроля с 12-часовым световым режимом и свободном доступе к воде и пище. Всего использовано 24 животных.

# Опухолевые модели

Модельные опухоли получали путем подкожной инъекции животным суспензии клеток, в фосфатно-буферном растворе в количестве 2,5 млн клеток. Общий объем инъекции составлял 100 мкл. Каждому животному прививали по две опухоли В верхнюю часть бедра. При проведении исследований неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по позвоночных зашите животных, используемых лля экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.). Исследования проводились с разрешения этического комитета (протокол № 1 заседания Этического Комитета
НижГМА по проведению научных исследований с участием человека и животных в качестве объекта исследований от 11 января 2010). Перед проведением хирургических манипуляций животных наркотизировали путем внутримышечного введения раствора золетила (40 мг/кг) с добавлением рометара (10 мг/кг), общий объем вводимого раствора – 60 мкл.

### 2.2 Методы и методики исследования

Культивирование опухолевых клеток. Клетки рутинно культивировали в среде ДМЕМ с 10% содержанием бычьей сыворотки и добавлением пенициллина 100 мкг/мл и стрептомицина 100 мкг/мл в стандартных условиях культивирования при 37°C и влажности 80%, в атмосфере с 5% содержанием СО2. Субкультивирование производили при достижении клеточным монослоем 80% конфлюентности.

Получение трехмерных клеточных культур (опухолевых сфероидов). Трехмерные клеточные культуры формировали В 96-луночных ультранизкоадгезивных планшетах с круглым дном, плотность посева клеток составляла 350 клеток/100 мкл/лунку, затем планшет помещали на качалку и оставляли при 37°С и скорости 100 об/мин на 1.5 часа для формирования сфероидов. Методика была адаптирована из руководства производителя культуральных планшетов. По данным литературы трехмерные клеточные культуры более точно воспроизводят условия опухоли, формирующейся в организме, по сравнению с плоскими двумерными клеточными культурами и представляют собой модель опухоли до момента начала процессов ангиогенеза [141].

Моделирование взаимодействия опухолевых и стромальных клеток in vitro. Опухоль-стромальные взаимодействия моделировали путем совместного культивирования (сокультивирования) клеток Hela Kyoto, трансфецированных сенсором на pH - SypHer2, с фибробластами человека (huFB). В качестве контроля выступали соответствующие монокультуры опухолевых клеток. Для оценкт pH

цитозоля фибробластов использовали фибробласты, трансфецированные геном белка SypHer2 (huFB-SypHer2), и опухолевые клетки без сенсора. Для исследовани со-культуры опухолевые клетки и фибробласты высевали в соотношении 1:4 в количестве 20 и 80 тысяч, соответственно, на чашку со стеклянным дном в среде DMEM life (без фенолового красного). В качестве контроля выступали монокультуры либо опухолевых клеток, либо фибробластов в зависимости от дизайна эксперимента.

Колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток. Для определения чувствительности клеток к химиотерапевтическим препаратам и установления полумаксимальной ингибирующей концентрации (ИК50) использовали колориметрический тест (МТТ-теста) для оценки метаболической активности клеток. В качестве красителя использовали жёлтый тетразол, который восстанавливается в пурпурный формазан, только в живых клетках. В качестве растворителя использовали диметилсульфоксид. Оптическую плотность полученных проб измеряли с помощью многофункционального микропланшетного ридера (BioTek, Германия). Данные обрабатывали В программе MS Excel 2003.

Выявление живых и мертвых клеток. Клетки, погибшие в результате химиотерапевтического воздействия, выявляли с помощью флуоресцентного красителя пропидиума йодида, не способного проникать внутрь живых клеток, имеющих неповрежденную мембрану, И, образом таким селективно окрашивающих только мертвые клетки. Данный краситель имеет максимум возбуждения флуоресценции на длине волны 535 нм и максимум эмиссии – на длине волны 617 нм. Краситель использовали в соответствии с рекомендациями производителя. Для этого клеточную культуру дважды промывали раствором PBS в течение 5 минут, затем заливали раствором красителя в концентрации 10 мкМ и инкубировали 15 минут. После этого клеточную культуру промывали и заливали раствором PBS.

При исследовании динамики роста опухолевых сфероидов проводили двойное окрашивание с помощью флуоресцентных красителей пропидиума йодида и кальцеина. Окрашивание производили, как описано выше с добавлением красителя кальцеин. Флуоресцентный сигнал оценивали методом широкопольной флуоресцентной микроскопии.

Оценка клеточной пролиферации. Для оценки клеточной пролиферации клетки помещали в 12-луночный планшет в концентрации 1x10<sup>5</sup> клеток в 1 мл. Через 24 часа добавляли исследуемый препарат и инкубировали в течение 45 мин, 6, 24 или 48 часов. Затем среду из каждой лунки собирали в отдельные пробирки, клетки открепляли с помощью 0.25% раствора трипсина в ЭДТА. Клеточную суспензию из каждой отдельной лунки смешивали с соответствующей средой, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут и разводили в 1 мл раствора РВS. Отбирали 10 мкл клеточной суспензии и смешивали с 10 мкл раствора трипанового синего. С помощью автоматического счетчика клеток ТС20 (Віо-Rad, USA) производили подсчет клеток с учетом мертвых клеток (клетки, окрашенные трипановым синим). Данные представляли в виде общего числа клеток с указанием процента мертвых клеток от общего числа.

Химиотерапевтическое воздействие in vitro. Для определения ИК50 цисплатина клетки помещали на 96 луночный планшет в концентрации 3x10<sup>3</sup> клеток на 100 мкл. Спустя 24 часа добавляли в ростовую среду препарат в концентрациях 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 мкМ и инкубировали в течение 48 часов, затем проводили МТТ-тест по описанной выше методике. Эксперимент проводили в трех повторностях, на каждую концентрацию было использовано по 10 лунок 96луночного планшета.

Далее при проведении экспериментов с химиотерапевтическим воздействием добавляли препарат в концентрации равной ИК50 для мономерной клеточной культуры и 2хИК50 – для трехмерной клеточной культуры.

В работе Генетически-кодируемы сенсор. использован новый флуоресцентный генетически-кодируемые сенсор, чувствительный к изменению pH - SypHer2, разработанный в Институте биоорганической химии РАН, г. Москва в рамках совместных проектов [140, 142]. Сенсор SypHer2 создан на основе желтого флуоресцентного белка YFP (yellow fluorescent protein), представляет собой мономер. Белковая молекула сенсора имеет структуру, типичную для белков семейства YFP. За чувствительность белка к pH отвечает хромофор, который может находиться в анионном или нейтральном состояниях. В зависимости от соотношения этих состояний меняются его флуоресцентные характеристики. Белок имеют два пика возбуждения на длине волны 420 нм и 500 нм и пик эмиссии на длине волны 516 нм. При изменении значения рН интенсивность флуоресценции на двух пиках меняется разнонаправленно, что позволяет не просто регистрировать интенсивность флуоресценции, a рассчитывать отношение интенсивности флуоресценции на одном пике к интенсивности флуоресценции на другом пике, т.е. проводить рациометрическое измерение (рисунок 6).

Флуоресцентная лазерная сканирующая микроскопия. Для регистрации флуоресценции генетически-кодируемых сенсоров in vitro использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 710 (Carl Zeiss, Германия). Изображения строились с помощью водно-имерсионного объектива С-Аросhromat W Korr с сорокакратным увеличением и числовой апертурой 1.2, что позволило получить поле зрения 213\*213 микрон с разрешением 1024\*1024 пиксела. В качестве источника возбуждающего излучения на длине волны 405 нм использовали диодный лазер, для возбуждения флуоресценции на длине волны 488 нм – аргоновый лазер, регистрировали флуоресценцию в диапазоне от 435 нм до 550 нм.



Рисунок 6. Спектральные характеристики сенсора SypHer2: А – спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции, Б – Изменение пиков возбуждения флуоресценции в зависимости от значения внутриклеточного рН. Приведено из [140].

Методика количественной обработки флуоресцентного сигнала генетически кодируемых сенсоров. В ходе выполнения работы была разработана методика оценки флуоресцентного сигнала сенсора на pH с помощью программы EMBL ImageJ. Для этого сначала вычитали фоновый сигнал (сигнал в зоне свободной от клеток, либо вне мыши) на каждом изображении, полученного при возбуждении светом с длиной волны 488-500 и 405-430 нм. Затем производили деление сигналов и получали результирующее изображение, на котором уровень сигнала в относительных единицах отражает уровень pH (рисунок 7).

Калибровка сенсора на pH. Калибровку сенсора SypHer2 в клетках проводили в буферах с высоким содержанием К+ (130 мМ глюконата калия, 20 мМ глюконата натрия, 0.5 мМ MgSO4, 0.2 мМ ЭД-ТА и 30 мМ Tris (pH 8.1 - 9.0) с добавлением HEPES в присутствии ионофоров 5 мкМ нигерицина и 5 мкМ монензина. Клетки инкубировали с каждым буфером не менее 3-4х минут для уравновешивания внеклеточного и внутриклеточного pH. Далее регистрировали и обрабатывали сигнал по описанным выше методикам. Примеры флуоресцентных

и результирующих изображений при разных значениях pH и калибровочная кривая представлены на рисунке 8.



Рисунок 7. Пример получения результирующего изображения сигнала сенсора SypHer2: А – флуоресценция сенсора при возбуждении светом с длиной волны 405 нм (I405), Б – флуоресценция сенсора при возбуждении светом с длиной волны 488 нм (I488), В – отношение интенсивностей флуоресценции (I488/ I405). Микроскоп LSM-710, увеличение х400.

## Химиотерапевтическое воздействие in vivo.

Схема лечения препаратом цисплатин. Лечение животных начинали по достижении опухолью ~0,5 см в диаметре (6-7 день после генерации опухоли). Трое животных получали цисплатин (5 мг/кг в 200 мкл PBS, внутрибрюшинно) три раза в неделю, всего 11 инъекций за 4 недели. Трем контрольным животным вводили 200 мкл PBS внутрибрюшинно в те же дни.

Схема лечения препаратом таксол. Лечение препаратом таксол начинали на 3-ий день после инокуляции опухолевых клеток. Четырем животным вводили таксол в дозе 10 мг/кг в 200 мкл PBS внутрибоюшинно 3 раза в неделю (всего 7-8 доз препарата), контрольным 4-м животным вводили 200 мкл PBS внутрибоюшинно в те же дни.

Опухоль измеряли с помощью штангенциркуля три раза в неделю и рассчитывали объем опухоли по формуле: V = a x b x b/2, где a – длина опухоли, b – ширина опухоли.

Флуоресцентный имиджинг in vivo. Для in vivo исследований использовали установку для молекулярного флуоресцентного имиджинга IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences, CША). На основании характеристик сенсора были использованы



Рисунок 8. Калибровка pH-чувствительного сенсора SypHer2. (А) флуоресцентный сигнал при возбуждении светом с длиной волны 405 (I405) и 488 (I488) и отношение интенсивностей флуоресценции (I488/I405) при повышении pH в диапазоне от 6,9 до 8,0; (Б) калибровочная кривая

соответствующие настройки для регистрации интенсивности флуоресценции: возбуждение на  $\lambda = 430$  нм и  $\lambda = 500$  нм, регистрация сигнала на  $\lambda = 540$  нм, время экспозиции 5 секунд, поле зрения – В, биннинг small. Для эффективного наблюдения сигнала генетически кодируемого сенсора опухоль открывали путем препарирования кожного лоскута непосредственно над опухолью. Для проведения хирургической операции животное наркотизировали путем внутримышечной инъекции смеси 5:1 золетила (40 мг/кг) и рометара. Сразу после флуоресцентного имиджинга на рану накладывали шов и обрабатывали его клеем для ран. Результаты обрабатывали в программе EMBL ImageJ.

Широкопольная флуоресцентная микроскопия. Для исследования ex vivo образцов опухоли, полученных из клеток, трансфецированных генетически кодируеммым сенсором на pH, использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп DM IL LED (Leica, Германия). Для возбуждения флуоресценции на длине волны 430 нм использовали фильтр CFP ET (Ex: BP 436/20, Em: BP 480/40), а для возбуждения флуоресценции на длине волны 500 нм – фильтр YFP ET (Ex: BP 500/20, Em: BP 535/30).

После эвтаназии животных путем дислокации шейных позвонков были получены образцы опухоли для *ex vivo* анализа. Опухоль забирали и моментально помещали в жидкий азот для сохранения флуоресценции сенсора. Затем опухоль помещали в специальную среду для замороженных образцов (О.С.Т. compaund) и с помощью криотома LeicaCV1900UV (Leica, Германия) получали криосрезы толщиной 20 мкм.

Флуоресценцию красителей для выявления живых и мертвых клеток регистрировали с использованием следующих фильтров: фильтр YFP ET (Ex: BP 500/20, Em: BP535/30) для кальцеина (живые клетки) и фильтр TX2 (Ex: BP 560/40, Em: BP 645/75) – для пропидиум йодида (мертвые клетки). Для регистрации флуоресцентного сигнала метки FITC также использовали фильтр YFP ET (Ex: BP 500/20, Em: BP535/30).

Гистологическое исследование. Часть исследуемой опухоли помещали в 10% забуференный формалин для фиксации. Далее ткань помещали в формалин и готовили срезы толщиной 5–7 мкм по стандартной методике с окраской гематоксилином и эозином для детального морфологического анализа. Для установления соответствия зон флуоресценции и морфологических структур производили окрашивание криосрезов после регистрации флуоресцентного сигнала также по стандартной методике.

Иммуногистохимические исследования. Иммуногистохимические исследования проводили для выявления взаимосвязи водородного показателя pH с содержанием кислорода в ткани. Для этого животным с опухолью внутривенно вводили раствор пимонидазола в дозе 60 мг/кг за 30-40 минут до забора опухоли. После забора опухоли получали криосрезы как описано выше. После инкубации среза в растворе 4% параформальдегида для удаления остаточной флуоресценции сенсора, срез окрашивали антителами к пимонидазолу, конъюгированными меткой FITC, в разведении 1:100 в соответствии с инструкцией производителя. Зоны гипоксии выявляли методом флуоресцентной микроскопии.

При исследовании опухолевых сфероидов проводили оценку экспрессии ламинина – основного гликопротеина базальных мембран. Для этого получали криосрезы сфероидов и инкубировали их в растворе антител к ламинину (разведение 1:100) во влажной камере при температуре +4°C в течение ночи, а затем инкубировали в растворе вторичных антител, конъюгированных меткой FITC. Экспрессию оценивали методом флуоресцентной микроскопии.

Статистическая обработка. Для каждой веременной точки В эксперименте анализировали 5-10 полей зрения. Обсчет проводился по 30-70 клеткам. Полученные данные рассчитывали как среднее значение (Mean) со стандартным отклонением (SD) или ошибкой среднего (SEM). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Колмагорова-Смирнова и критерия Шапиро-Уилка. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica10 (StatSoft, США). Были выполнены t-критерий Стьюдента и дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Бонферрони, различия считались статистически значимыми при p<0,05. Для определения корреляции между рНс и пролиферацией использовали критерий Пирсона (r). Согласно шкале Чеддока при значении коэффициента корреляции 0-0,5 сила связи слабая, 0,5-0,7 – средняя, 0,7-1,0 – сильная.

### 2.3 Схемы экспериментов

1. Изучение уровня внутриклеточного pH в процессе естественного роста опухоли на трехмерных опухолевых моделях in vitro

Для изучения уровня внутриклеточного pH опухолевых клеток в ходе естественного роста опухоли и формировании опухолевого узла *in vitro* были получены трехмерные модели опухоли по описанной выше методике. Регистрацию сигнала производили на 3-ий, 5-ый, 7-ой и 10-ый дни роста опухолевых сфероидов. Для сопоставления данных об уровне внутриклеточного pH и структуре опухолевых сфероидов в те же сроки было проведено окрашивание сфероидов для выявления живых и мертвых клеток, получены данные об экспрессии ламинина и проведено гистологическое окрашивание. Схема эксперимента представлена на рисунке 9.



Рисунок 9. Схема эксперимента по изучению уровня внутриклеточного pH опухолевых клеток при формировании опухолевого узла на трехмерной модели опухоли in vitro

2. Анализ динамики уровня pH цитозоля опухолевых и стромальных клеток при их взаимодействии

Для проведения исследований использовали сокультуры клеток Hela Kyoto, трансфецированных сенсором на pH - SypHer2, с фибробластами человека (huFB) и соответствующие монокультуры опухолевых клеток. Для экспериментов по исследованию pH цитозоля фибробластов использовали фибробласты человека (huFB), трансфецированные сенсором на pH - SypHer2, и клетки Hela Kyoto без сенсора. Для получения сокультур опухолевые клетки и фибробласты высевали на чашки со стеклянным дном в соотношении 1:5, общее количество клеток на чашку – 100 тысяч. В качестве контроля выступала монокультура опухолевых клеток в количестве 100 тысяч на чашку. Спустя 24 часа после посева, клетки переводили на среду с пониженным содержанием сыворотки (5% вместо 10%) и без содержания фенолового красного. Регистрацию флуоресценции сенсора проводили через 24, 48, 72 и 120 часов после посадки клеток на чашки по описанным ниже методикам. Схема эксперимента представлена на рисунке 10.



Рисунок 10. Схема эксперимента по изучению уровня внутриклеточного pH в опухолевых и стромальных клетках (фибробластах) при их взаимодействии

3. Изучение уровня внутриклеточного pH в процессе естественного роста опухоли in vivo

Для исследования были получены опухоли с использованием линии клеток Hela Kyoto, стабильно экспрессирующих pH-сенсор SypHer2. Для оценки флуоресценцию внутриклеточного pН опухолевых клеток опухолей регистрировали в динамике по дням роста 7, 10, 14 и 18 с помощью установки IVIS-Spectrum (Caliper Life Sciences, США) по ранее описанной методике. По наблюдения были окончании МЫШИ наркотизированы, опухоли были

хирургическим путем удалены для сохранения флуоресценции белка, половина каждой опухоли была немедленно помещена в жидкий азот, другая – в 10% формалин. Животные были выведены из эксперимента путем дислокации шейных позвонков.

С замороженных опухолей были получены криосрезы и сразу же проводили регистрацию флуоресценции методом широкопольной флуоресцентной микроскопии. Полученные изображения обрабатывали в программе EMBL ImageJ.

Для выявления зон гипоксии проводили иммунногистохимический анализ. Схема эксперимента представлена на рисунке 11.



Рисунок 11. Схема эксперимента по изучению уровня внутриклеточного pH опухолевых клеток в процессе естественного роста опухоли in vivo

4. Изучение динамики уровня внутриклеточного pH при воздействии иисплатина in vitro

Для наблюдения за динамикой уровня pHc при воздействии цисплатина клетки помещали на чашки для флуоресцентной микроскопии в количестве 1x10<sup>5</sup> клеток/2 мл/чашка. Для работы использовали чашки с разлинованным дном для

наблюдения одних и тех же полей зрения в динамике. Через 24 часа добавляли цисплатин в концентрации, равной ИК50. Регистрацию флуоресценции проводили в начальной точке, потом через каждые 40 минут в течение первых 6 часов, а затем через 24 и 48 часов. После окончания наблюдений клетки окрашивали продиума йодидом для выявления мертвых клеток.

Для проведения экспериментов на трехмерных моделях опухоли, предварительно получали опухолевые сфероиды и добавляли цисплатин по достижении ими возраста 5 дней. Регистрацию флуоресценции проводили в начальной точке, потом через 3, 6, 24 и 48 часов. Для каждой серии наблюдений сфероиды. По брали отдельные опухолевые окончании воздействия химиопрепарата проводили окрашивание для выявления живых и мертвых клеток. Схема эксперимента представлена на рисунке 12.

5. Изучение динамики уровня внутриклеточного pH при воздействии цисплатина in vivo

Для наблюдения динамики уровня pHc у самок мышей линии nude, массой 20-22 г. были получены подкожные опухоли по описанной выше методике. Лечение начинали на 6-7 день. Было сформировано две группы: контрольная и опытная, по 3 мыши в каждой группе. Забор и обработку опухолей проводили как описано выше. Схема эксперимента представлена на рисунке 13.



Рисунок 12. Схема эксперимента по изучению динамики уровня внутриклеточного pH при химиотерапевтическом воздействии *in vitro*. А – для двумерной культуры, Б - для трехмерной культуры



Рисунок 13. Схема эксперимента по изучению динамики уровня внутриклеточного pH опухолевых клеток в процессе лечения опухоли цисплатином *in vivo* 

5. Изучение динамики уровня внутриклеточного pH при воздействии таксола in vivo

Для наблюдения динамики уровня pHc у самок мышей линии nude, массой 20-22 г. были получены подкожные опухоли по описанной выше методике. Лечение начинали на 3 день после инъекции суспензии клеток. Было сформировано две группы: контрольная и опытная, по 4 мыши в каждой группе. Забор и обработку опухолей проводили, как описано выше. Схема эксперимента представлена на риунке 14.



Рисунок 14. Схема эксперимента по изучению динамики уровня внутриклеточного рН

опухолевых клеток в процессе лечения опухоли таксолом in vivo

## Глава 3

## Результаты и их обсуждение

# 3.1 Изучение pH цитозоля опухолевых клеток in vitro с помощью генетически кодируемого сенсора SypHer2

В начале исследований была проведена калибровка сенсора SypHer2, экспрессируемого в клетках Hela Kyoto и построена калибровочная кривая для определения водородного показателя в абсолютных единицах. Калибровочная кривая представлена в разделе «Материалы и методы». Далее была проведена регистрация сигнала сенсора В клетках условиях естественного В культивирования. С помощью калибровочной кривой было установлено, что внутриклеточный pH клеток Hela Kyoto составил 7,34 ± 0,11. Полученное значение согласуется с известными данными о величине цитоплазматического рН  $7,33 \pm 0,13$  [143] или ~7,4 [138, 144] в клетках линии Hela Kyoto, но несколько выше, чем  $7,11 \pm 0.12$  – значение, полученное в другом исследовании [145].

Для изучения внутриклеточного водородного показателя опухолевых клеток *in vitro* была выбрана трехмерная клеточная культура – опухолевые сфероиды, поскольку они лучше отражают особенности опухоли по сравнению с двумерной культурой. Так, в сфероидах была продемонстрирована неоднородная экспрессия клеточных рецепторов, регулирующих клеточную адгезию и метаболизм, наблюдалась выработка межклеточного матрикса, а также градиент кислорода и питательных веществ, ведущий к формированию некротического ядра и различий В клеточной пролиферации [146, 147]. Градиент pO2 И разница В пролиферативной активности также может привести к отличиям pHc в разных зонах сфероида [141, 148]. Для проведения исследований были получены опухолевые сфероиды из клеток, экспрессирующих сенсор на рН.

Были проведены исследования роста и развития сфероидов в течение 10 дней На рисунке 15 представлены график роста сфероидов и морфологические изменения, которые сфероиды претерпевают в процессе развития. Видно, что на 3-ий день развития сфероиды представляют собой агломераты довольно рыхло расположенных клеток, к 5-ому дню культивирования сфероиды становятся более плотными. К 7-ому дню культивирования у сфероида формируется ядро из плотно расположенных клеток и оболочка из более рыхло расположенных клеток, а к 10 дню наблюдения начинается распад сфероидов из-за их большого размера. Для выявления живых и мертвых клеток целые сфероиды были окрашены флуоресцентными красителями (кальцеин и пропидиума йодид). Окрашивание выявило появление единичных мертвых клеток в центре сфероида на 5-ый день культивирования с формированием массивного некротического ядра к 10-му дню роста сфероидов. Известно, что формирование некротического ядра является типичной чертой сфероидов более 500 мкм в диаметре [146, 149].

Гистологический анализ с окрашиванием гематоксилином и эозином также выявил плотную структуру сфероидов на 5 и 7 дни с небольшим содержанием мертвых клеток в центре и разрушение структуры к 10-му дню культивирования. Кроме того, в ходе роста сфероидов было проанализировано накопление ламинина – ключевого гликопротеина внеклеточного матрикса. На 3-ий день культивирования флуоресценция практически не детектировалась, что говорит о низком содержании ламинина, на 5 и 7 дни количество ламинина было максимальным, и к 10-му дню флуоресцентный сигнал от ламинина вновь снижалась, что говорит о разрушении внеклеточного матрикса сфероида (рисунок 15А).



Рисунок 15. Характеристика опухолевых сфероидов в процессе роста. (А) изображения сфероидов в проходящем свете, окрашивание флуоресцентными красителями для выявления живых (кальцеин, зеленый цвет) и мертвых (пропидиума йодид, красный цвет) клеток, гистологические изображения (криосрезы, окрашивание гематоксилином и эозином), иммуногистохимические срезы (антитела к ламинину, конъюгированные меткой FITC) на 3-ий, 5-ый, 7-ой и 10-ый дни культивирования. Масштабная линейка 500 мкм. (Б) график роста сфероидов, диаметр измерен по изображениям в проходящем свете.

Поскольку сфероид является плотной структурой, были проведены предварительные исследования для определения максимально возможной глубины визуализации сигнала.

На рисунке 16 представлены изображения опухолевого сфероида, полученные на длинах волн 405 и 488 нм и анализ спадания сигнала с глубиной в

центральной и периферической частях сфероида. Было показано, что, по крайней мере, до глубины ~90 мкм интенсивность фиолетового и синего цветов спадала эквивалентно, однако при глубине более 50 мкм для обеих длин волн отношение сигнал/шум не превышало 10. Во избежание

некорректных измерений анализ рНс в сфероидах производили до 50 мкм.



Рисунок 16. Анализ изменения сигнала сенсора SyPher2 с глубиной. А – флуоресцентные изображения сфероидов, полученные при возбуждении светом с длиной волны 405 и 488 нм; Б – Спадание интенсивности флуоресценции на периферии сфероида; В – спадание интенсивности флуоресценции в центре сфероида; Г – зоны детектирования сигнала сенсора; Д – изменение отношения сигналов с глубиной.

На рисунке17 показаны результирующие изображения сигнала сенсора в сфероиде на 7 день культивирования (размер сфероида ~500 мкм) и диаграмма динамики pHc в процессе роста сфероидов отдельно для центральной и

периферической частей сфероида. Видно, что сфероид на 7-ой день роста не однороден по распределению сигнала сенсора, в нем визуализируются зоны с разным значением отношения сигналов, а, соответственно, и с разным значением pH. Количественный анализ показал, что на периферии уровень pHc составил 7,32  $\pm$  0,06, а в центре сфероида – 7,23  $\pm$  0,06 (p-0,00000, n=7, 10-15 клеток для каждого сфероида). В другие дни наблюдения значения pHc находились в пределах 7,15, что несколько ниже значений, полученных для клеток, растущих в двумерных культурах (~7,34). Следовательно, pHc в опухолевых клетках, растущих в условиях двумерной культуры ближе к таковым значениям pHc у активно пролиферирующих клеток на периферии сфероидов и можно предположить, что пролиферативная активность клеток в двумерной культуре выше, а в сфероиде ниже.

Данные, полученные с помощью предложенного метода анализа pHc, хорошо согласуются с литературными данными. Градиент pH был показан в трехмерных опухолевых моделях различного происхождения. Так, самые первые исследования Acker и соавторов показали снижение pH от периферии сфероидов к центру [150, 151]. Однако данные исследования были проведены с использованием микроэлектродов, что не позволяет достоверно отличить pH цитозоля от pH межклеточного пространства.

В исследованиях анализ pН проводили с использованием других синтетических красителей, чувствительных pН к уровню И методов флуоресцентной микроскопии. Так, Hulikova и соавторы, используя краситель carboxy-SNARF-1, проникающий через клеточные мембраны, показали отличия рНс на 0,1-0,2 единицы рН в центре и на периферии сфероидов, полученных из клеток линий HT29 и HCT116 [148]. Swietach и соавторы с использованием того же сенсора показали снижение pHc на 0,25 единиц в центре сфероидов из клеток рака мочевого пузыря RT112 [152]. На трехмерных моделях метастатического рака яичников OvCa с использованием сенсора на pHc SNARF-4 F было показано наличие более кислого pHc в ядре крупных и мелких сфероидов [141]. Похожие результаты были получены и для сфероидов, выделенных из рака желудка

человека, с использованием красителя ВСЕСГ [153]. Таким образом, полученные нами данные о более щелочном значении pHc в быстро пролиферирующей оболочке сфероидов коррелируют с данными, полученными с использованием экзогенных красителей.



Рисунок 17. Распределение зон с различным значением pHc в опухолевом сфероиде на 7 день роста. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия увеличение x20 (A) и x40 (Б). На рисунке (Б) показаны репрезентативные изображения центральной и периферической частей сфероида. (В) Динамика pHc в центре сфероида и на его периферии в процессе их роста, среднее ± CO, n=7.

Масштабная линейка 50 мкм для всех изображений

\* - статистически значимые различия значений pHc в центре сфероида и на периферии,  $p{<}0{,}05$ 

Считается, что градиент pHc в сфероидах коррелирует с градиентом содержания питательных веществ, включая глюкозу, ATФ и кислород, что ведет к реорганизации метаболических процессов и изменению активности клеток [154-156]. Недостаточное снабжение кислородом, питательными веществами и ATФ в комбинации с отсутствием транспортных систем, выводящих продукты жизнедеятельности из центра сфероида, ведет к накоплению продуктов анаэробного метаболизма, преимущественно лактата в цитоплазме клеток [141,

148, 154, 157]. Однако точные механизмы, отвечающие за формирование градиента pHc в такой гетерогенной структуре как сфероиды, еще предстоит установить.

Таким образом, предложенная нами модель опухолевых сфероидов, экспрессирующих генетически кодируемый сенсор на pH SypHer2, отражает свойственные опухоли особенности и является перспективным подходом изучения внутриклеточного pH в динамике при различных влияниях, моделирующих воздействие на опухоль.

# 3.2 Исследование динамики pH цитозоля опухолевых и стромальных клеток (фибробластов) с помощью генетически кодируемых сенсоров SypHer2/Hyper2 при их взаимодействии in vitro

Исследование влияния взаимодействия опухолевых и стромальных клеток на уровень внутриклеточного водородного показателя проводили *in vitro* при совместном культивировании опухолевых клеток Hela Kyoto, экспрессирующих либо генетически кодируемый сенсор на pH SypHer2 и нормальных фибробластов человека (huFB). Получение со- и монокультур описаны в разделе «2.3 Схемы экспериментов».

В условиях монокультивирования внутриклеточный рН опухолевых клеток оставался стабильным на протяжении первых трех дней наблюдения, в последний день наблюдения pHc опухолевых клеток снижался до значения 7,16±0,06 относительно исходного значения 7,23±0,07 (рис.18). Однако в условиях совместного культивирования с фибробластами значение внутриклеточного рН было ниже, чем в монокультуре, начиная с первого дня культивирования (7,15±0,09 и 7,23±0,07, соответственно), в последний день наблюдения, несмотря на снижение pHc опухолевых клеток в монокультуре по-прежнему наблюдалось более низкое значение pHc опухолевых клеток в условиях сокультуры (7,16±0,06 и 7,08 $\pm$ 0,06, соответственно, p=0,00000). Таким образом, было показано снижение внутриклеточного водородного показателя В процессе взаимодействия опухолевых клеток с фибробластами. Кроме того, параллельно нами был показан

сдвиг метаболизма опухолевых клеток в сторону преобладания гликолиза [158]. Следовательно, можно предположить формирование взаимодействия между клетками Hela и фибробластами по гликолитическому типу, что согласуется с литературными данными [159-162].

С другой стороны, полученные нами, данные противоречат утверждению, что для реакций гликолиза предпочтительными являются более щелочные условия. Однако, совсем недавно в работе Swietach и соавторов было показано, что чрезмерно щелочная среда ведет к диссоциации молочной кислоты и ее удержанию внутри клетки с последующим ингибированием гликолиза за счет накопления его конечного продукта. Также в этом исследовании было показано, что снижение pHc ниже 7,3 ведет к активации процессов гликолиза [23]. Таким образом, полученные нами данные, когда pHc гликолитической опухоли Hela не превышал 7.23 $\pm$ 0,07, подтверждают данные этого исследования.

Также были проведены исследования уровня внутриклеточного pH с помощью сенсора SypHer2 в фибробластах при совместном культивировании с опухолевыми клетками по аналогичной схеме. Было показано, что значения pHc постепенно снижаются с 7.47±0.09 на 1-й день до 7.14±0.10 на 5-й день в монокультуре и с 7.58±0.09 до 7.23±0.15 – в сокультуре. В монокультуре фибробластов динамика изменения pHc была такая же, как и в сокультуре. При этом уровень pHc фибробластов в условиях сокультуры был сдвинут в щелочную сторону по сравнению с монокультурой фибробластов на протяжении всего периода наблюдения (рис.19). Выявленное снижение pHc фибробластов в процессе культивирования может быть связано с накоплением продуктов обмена в процессе роста и размножения клеток, а также общим снижением активности клеток, вызванным контактным ингибированием.



Рисунок 18. Анализ pHc в опухолевых клетках в монокультуре и в сокультуре с фибробластами. А – рациометрические изображения  $I_{500}/I_{430}$  SypHer2 в опухолевых клетках на 1, 2, 3 и 5 дни культивирования; Б – pHc опухолевых клеток в монокультуре и сокультуре. \* - статистически значимое (p≤0,05) отличие от монокультуры в тот же день наблюдения, # - статистически значимое (p≤0,05) отличие от монокультуры в 1-ый день наблюдения

Таким образом, более щелочной уровень цитоплазматического рН по сравнению с монокультурой наблюдался в фибробластах, взаимодействующих с опухолевыми клетками, с первого дня культивирования. В работе Yan и соавт. также было показано увеличение значений внутриклеточного рН в опухольфибробластах нормальных добавлении ассоциированных И при среды, содержащей экзосомы от опухолевых клеток [163]. Кроме того, обнаруженные в этой работе более щелочные значения рН в фибробластах, взаимодействующих с опухолевыми клетками, сохранялись при смене внешних условий (снижение концентрации глюкозы и повышение концентрации лактата) и даже при активном транспорте лактата внутрь клеток и изменении метаболических процессов.



Рисунок 19. Изменения pH цитозоля фибробластов в условиях сокультивирования с опухолевыми клетками. А – Репрезентативные микроскопические изображения фибробластов и сокультуры фибробластов с опухолевыми клетками на 5-й день культивирования. Масштабная линейка 50 мкм. Количественная оценка pHc. M±SD, n=30-40 клеток. \*, p≤0.05 в сравнении с монокультурой. Б - изменения pH цитозоля опухолевых и стромальных клеток при их сокультивировании.

# 3.3 Изучение рН цитозоля опухолевых клеток in vivo с помощью генетически кодируемого сенсора SypHer2

Для изучения внутриклеточного водородного показателя опухолевых клеток *in vivo* были получены опухоли из клеток Hela Kyoto, экспрессирующих генетически кодируемый сенсор на pH SypHer2 согласно описанным выше методикам. Регистрацию сигнала сенсора проводили с помощью установки для молекулярного флуоресцентного имиджинга IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences, CША) по описанной методике в динамике согласно схеме эксперимента.

Поскольку предварительные исследования показали, что уровень сигнала сенсора, детектируемый через кожу значительно ниже, чем сигнал непосредственно с поверхности опухоли, для регистрации флуоресценции

животных наркотизировали и хирургическим путем снимали кожный лоскут с опухоли (см. раздел «Материалы и методы»).

На рисунке 20 представлен пример флуоресцентных изображений, полученных с помощью установки IVIS Spectrum при возбуждении светом с длиной волны 430 и 500 нм, а также результирующее изображение опухоли на 18 день культивирования. Также представлены примеры результирующих флуоресцентных изображений опухоли в динамике в дни роста 7, 10, 14 и 18.

Расчет отношения  $I_{500}/I_{430}$  выявил высоко гетерогенный сигнал сенсора SypHer2 в пределах одной опухоли, что говорит о наличии зон с разными уровнями pHc в пределах опухоли. Каждая опухоль имела свой рисунок распределения сигнала. Полученные нами данные согласуются с представлением об опухоли как о фенотипически и функционально гетерогенной системе. При этом каждая опухоль отличается от другой и в пределах отдельной опухоли также наблюдается неоднородность [164]. Гетерогенность pH в солидных опухолях была продемонстрирована и ранее, в частности с использованием красителя 5,6-CF [165] или MPC [166].

Макроскопически опухоль представляет собой плотную структуру, состоящую из отдельных узлов, визуализируются сосуды и участки желтоватого и яркокрасного цвета (рисунок 20,Б). Анализ отношения  $I_{500}/I_{430}$  показал, что в каждом отдельном опухолевом узле  $I_{500}/I_{430}$  меньше в центре (более кислое значение pHc), что соответствует картине в опухолевых сфероидах. Вероятно, более кислый уровень pHc является результатом активного метаболизма глюкозы и низкой перфузии крови. Сопоставление распределения отношения  $I_{500}/I_{430}$  с данными гистологического исследования выявил соответствие зон с высоким значением  $I_{500}/I_{430}$  (более щелочной pHc) зонам некроза (рисунок 20,Б). Количественный анализ отношений  $I_{500}/I_{430}$  по 10 опухолям (в каждой от 3 до 6 отдельных узлов) выявил статистически значимые отличия между центральной и периферической частями отдельных опухолевых узлов и зонами некроза.

По мере роста опухоли гетерогенность сигнала увеличивалась, однако значимых изменений пространственного распределения сигнала не происходило.

Поскольку уровень pH может отражать жизнеспособность опухолевых клеток и изменения уровня pHc, связанные и с метаболическим статусом клеток и с уровнем оксигенации, были проведены гистологические исследования и анализ



Рисунок 01. Распределение зон с различным значением pHc в опухоли in vivo. (А) распределение и изменение сигнала сенсора в процессе роста опухоли; (Б) верхний ряд: флуоресцентные изображения, полученные при возбуждении светом с длиной волны 430 и 500 нм (детекция на длине волны 540 нм) и результирующее изображение I<sub>500</sub>/I<sub>430</sub>; количественный анализ отношения I<sub>500</sub>/I<sub>430</sub> в центре и на периферии отдельного опухолевого узла (n=42) и в зоне некроза (n=16). Нижний ряд: увеличенное результирующее флуоресцентное изображение, контурной линией обозначен отдельный опухолевый узел на флуоресцентном изображении и макрофотографии опухоли; сплошная белая линия – линия разреза пухоли; гистологический срез (окрашивание Г/Э), Н – некроз. Шкала 3 мм для всех изображений

\* - статистически значимые различия значений, р<0,05

гипоксии в опухолях, экспрессирующих SypHer2. Были получены свежие криосрезы опухолей, проведен анализ флуоресценции сенсора SypHer2, а затем стандартное гистологическое исследование с окрашиванием гематоксилином и эозином. Дополнительно был проведен иммуногистохимический анализ последовательных криосрезов с окрашиванием антителами к пимонидазолу, конъюгированными меткой FITC.

Было показано, что зоны с высокими значениями отношения I<sub>500</sub>/I<sub>430</sub> соответствовали зонам некроза и гипоксии (рисунок 21).



Рисунок 21. Соответствие между пространственным распределением рациометрического сигнала сенсора на pH, морфологической структурой опухоли и данными о гипоксии: Слева направо: результирующее рациометрическое изображение сигнала сенсора SypHer2 (F500/F430); окрашивание гематоксилином и эозином; иммуногистохимическое окрашивание антителами к пимонидазолу, конъюгированными флуоресцентной меткой FITC. Н –некроз, О - опухоль, масштабная линейка 100 мкм.

Таким образом, при исследовании уровня внутриклеточного pH с помощью генетически кодируемого сенсора SypHer2 и флуоресцентных методов визуализации *in vivo* в процессе естественного роста опухоли было показано, что опухоль неоднородна по уровню pHc, распределение зон с разными значениями pHc сохраняется в процессе роста опухоли, а в пределах отдельного опухолевого узла согласуется с таковым распределением в опухолевых сфероидах. С помощью гистологического и иммуногистохимического анализов *ex vivo* было показано, что зоны с более щелочным значением pHc соответствуют зонам некроза и гипоксии.

Известно, что гипоксия, будучи типичной чертой солидных опухолей, ведет к ацидозу, поскольку способствует переключению метаболизма с окислительного

фосфорилирования в сторону гликолиза, что ведет к накоплению кислых продуктов обмена [167]. Однако длительный недостаток кислорода ведет к хроническому гипоксическому стрессу и некротической гибели клеток, поэтому некроз является другой типичной чертой опухолей. Еще в 1980-х годах с использованием микроэлектродов было показано, что в подобных зонах с развившимся некрозом pH был сдвинут в щелочную сторону [168, 169]. Вероятно, это происходит из-за сокращения образования кислых метаболитов по мере истощения запасов гликогена. Кроме того, при гистологическом анализе в зонах некроза были обнаружены участки обизвествления (кальцификации), что само по себе является отличительной чертой многих опухолей и следствием хронической гипоксии и развития некроза [170, 171]. В работах других авторов было показано, что дистрофическая кальцификация требует повышенной активности щелочной фосфатазы и повышенного уровня pH [172, 173].

# 3.4 Исследование динамики pH цитозоля опухолевых клеток с помощью генетически кодируемого сенсора SypHer2 при воздействии цисплатина in vitro u in vivo

На первом этапе работы были изучены выживаемость клеток линии Hela-SypHer2 и активность их пролиферации под влиянием цисплатина. На рисунке 22 видно, что в результате воздействия цисплатина пролиферация снижается, а процент мертвых клеток увеличивается по сравнению с контролем без лечения в зависимости от времени инкубации. Спустя 6 часов воздействия цисплатина, наблюдается небольшое, но статистически значимое снижение пролиферативной активности (p=0,015), а процент мертвых клеток примерно на 3,5% выше в группе леченых клеток по сравнению с контролем. С увеличением времени инкубации клеток с цисплатином общее количество клеток не меняется, что говорит об остановке клеточного деления, а процент мертвых клеток возрастает до 11% спустя 24 часа и затем до-30% спустя 48 часов.



Рисунок 22. Влияние цисплатина на пролиферативную активность и выживаемость опухолевых клеток Hela-SypHer2. А – количество живых клеток Hela-SypHer2. Б – процент мертвых клеток (окрашенных трипановым синим).

\* - статистически значимое отличие клеток Hela-SypHer2, леченых цисплатином, от нелеченых, р≤0,05

Стабильная экспрессия pH-чувствительного сенсора SypHer2 позволила проследить изменение pHc опухолевых клеток в ответ на лечение цисплатином. Для изучения связи динамики pHc и ответа на лечение цисплатином pHc был проанализирован отдельно в выживших клетках с ингибированной пролиферацией и погибших опухолевых клетках.

Исходный pHc (до добавления препарата) В обеих клеточных субпопуляциях был практически одинаков  $(7.34\pm0.10)$ 7,38±0,10, И соответственно). Уже через 45 минут после добавления препарата рНс снизился примерно на 0,2 единицы в обеих группах клеток (рисунок 23), что говорит о запуске неспецифических механизмов закисления цитоплазмы.

Дальнейшие наблюдения показали, что в погибших впоследствии клетках наблюдались заметные колебания уровня pHc в период с 80 минуты наблюдения до 5 часов после добавления препарата (рисунок 23Б). Клеточная гибель в период



Рисунок 23. Динамика pHc в опухолевых клетках Hela-SypHer2 при воздействии цисплатина. А – репрезентативные рациометрические изображения и окрашивание пропидиумом йодида спустя 24 часа (время после добавления цисплатина указано на каждом изображении, масштабная линейка 50 мкм). Б – ранние изменения pHc в клетках, которые в последствии погибли (в отдельных клетках и среднее значение, n=11). В - ранние изменения pHc в клетках со сниженной пролиферативной активностью (в отдельных клетках и среднее значение, n=75). Г – критерий корреляции Пирсона между pHc и пролиферативной активностью (пролиферация представлена в % от контроля). \* - статистически значимое отличие от исходного pHc, p≤0,05

с 6 до 24 часов после добавления препарата привела к невозможности дальнейшей регистрации уровня pHc.

В противоположность погибшим клеткам у клеток со сниженной пролиферативной активностью наблюдался длительный и стабильный период защелачивания. У данных клеток в течении 2-2,5 часов значения pHc заметно сдвигались в более щелочную сторону и оставались таковыми до 4,5-5-ти часов наблюдения, что свидетельствует о высокой способности клеток к поддержанию гомеостаза pHc в присутствии цисплатина (рисунок 23В). Затем pHc постепенно снижался и в точках наблюдения 24 и 48 часов был статистически ниже исходного значения.

Хотя колебания pHc считаются важным фактором контроля пролиферативной активности клеток [174], в нашем исследовании корреляция между уровнем pHc при воздействии цисплатина и пролиферативной активностью не была установлена ( $r^2=0,4151$ , рисунок 23Г).

Таким образом, не погибшие клетки со сниженной пролиферативной активностью принципиально отличались от погибших клеток способностью к длительному поддержанию более щелочного уровня pHc в присутствии цисплатина. Эти данные удалось получить благодаря возможности мониторить pHc в отдельных клетках. Средние значения pHc в двух исследуемых популяциях не выявили между ними различий (рисунок 23Б,В).

Затем была исследована динамика внутриклеточного pH на более сложной трехмерной клеточной модели – клеточных сфероидах. Для воздействия на сфероиды цисплатин добавляли в двойной полумаксимальной ингибирующей концентрации. Для оценки ответа сфероидов на воздействие цисплатином были проанализированы их размер, морфология и жизнеспособность клеток в течение 48 часов после добавления препарата (рисунок 24).

К 5-му дню роста сфероиды достигали ~450 мкм в диаметре с выраженной сердцевиной из плотно расположенных клеток и внешним слоем более рыхло расположенных и активно пролиферирующих клеток. К 7-му дню размер сфероидов достигал ~650 мкм в диаметре. При двойном окрашивании сфероидов

для выявления живых и мертвых клеток в контрольной группе сфероидов были выявлены единичные мертвые клетки на протяжении всего периода наблюдения с 5-го по 7-ой день. При воздействии цисплатина размер сфероидов достоверно снижался к 48 часам наблюдения. Количество же мертвых клеток в сфероидах, подвергшихся воздействию цисплатина, существенно увеличилось, спустя 24 и 48 часов по сравнению с контрольной группой. При этом большая часть мертвых клеток была расположена на периферии сфероидов, что связано с лучшей доступностью клеток для воздействия препарата и, видимо, их повышенной чувствительностью.



Рисунк 24. Влияние цисплатина на опухолевые сфероиды. А – репрезентативные изображения опухолевых сфероидов в проходящем свете. Б – кривые роста контрольных сфероидов и сфероидов при воздействии цисплатина. В – двойное флуоресцентное окрашивание для выявления живых (кальцеин, зеленый цвет) и мертвых (пропидиума йодид, красный цвет) клеток. Г – количество мертвых клеток в опухолевых сфероидах. Масштабная линейка 200 мкм для всех изображений, \* - статистически значимое отличие от контрольной группы.

В опухолевых сфероидах динамика внутриклеточного pH клеток, расположенных на периферии и в центре, несколько отличалась (рисунок 25). Так, спустя 3 часа pHc опухолевых клеток, расположенных как на периферии, так и в центре сфероидов, сдвигался в более щелочную сторону, достигая значений ~7,3. Затем к 6 часам воздействия препарата в клетках на периферии сфероидов, как и в случае с клеточным монослоем, значения pHc снижались до исходных и статистически не отличались от контрольных значений. В центре же сфероида сохранялся более щелочной уровень pHc. Также стоит отметить, что, в отличие от монослоя, как в центре, так и на периферии сфероидов сохранялся более щелочной уровень pHc по сравнению с контролем при наблюдении в течение 24 и 48 часов.



Рисунок 25. Динамика pHc в опухолевых сфероидах из клеток Hela-SypHer2 при воздействии цисплатина. А – карта распределения pHc в контрольных сфероидах и при воздействии цисплатина. Б – динамика pHc на периферии сфероида. В – динамика pHc в центре сфероидов, значения представлены в виде средних±SD, n=50. масштабная линейка 200 мкм для всех изображений.

\* - статистически значимые отличия, p<0,05

Стоит учитывать, что уже, спустя 24 часа регистрировалось большое количество мертвых клеток при воздействии цисплатина, а к 48 часам наблюдения размер «леченых» сфероидов существенно снижался в основном за счет гибели и открепления клеток с периферии, т.е. можно говорить о наблюдении клеток, составляющих исходно центр сфероида.

Таким образом, можно заключить, что динамика pHc в опухолевых клетках, расположенных на периферии сфероидов, ближе к таковой в монослое и отражает «лечебный» эффект цисплатина. Что касается более длительного периода защелачивания в центре сфероидов, где наблюдалось меньшее число, мертвых клеток, то данное явление может быть связано с известной гипотезой о более щелочном значении pHc в клетках, устойчивых к цисплатину [2-4].

На последнем этапе исследований было изучено изменение уровня внутриклеточного pH в опухолях Hela *in vivo* при лечении животныхопухоленосителей препаратом цисплатин. Опухоли были получены и пролечены, как описано в разделе «Материалы и методы». Было установлено торможение опухолевого роста, к 28 дню лечения наблюдалась статистически значимая разница между лечеными и нелечеными опухолями (рисунок 26).

На 35 день (спустя 3 дня после последнего введения цисплатина) животные подвергались эвтаназии, опухоли были забраны и разделены на две части: одна часть была направлена на гистологическое исследование, вторая – для исследования флуоресцентного сигнала сенсора SypHer2.

По результатам гистологического исследования контрольные опухоли были представлены плотной тканью, состоящей из крупных полиморфных клеток, плотно прилегающих друг к другу (рисунок 26Б). В крупных ядрах круглой или овальной формы визуализировался дисперсный хроматин. Базофильная цитоплазма была представлена тонким кольцом вокруг ядра. Митозы были обнаружены в 2,29% клеток. Опухолевая ткань была представлена клеточными комплексами, окруженными прослойками соединительной ткани, и имела слабую васкуляризацию. Таким образом, ~92% от общего числа клеток были представлены опухолевыми клетками без каких-либо типичными

морфологических изменений. Среди остальных клеток 3,21% были представлены клетками с дистрофическими изменениями различной степени выраженности, и 2,74% имели признаки апоптоза (конденсация хроматина, фрагментация ядра и эозинофильная реакция).



Рисунок 26. Влияние цисплатина на опухоли Hela-SypHer2 у мышей. А – изменение объема опухолей в ответ на лечение цисплатином ( $\circ$ ) в/б, 5 мг/кг, всего 11 введений в течение 4-х недель, начиная с 7-го дня опухолевого роста (день 0), мыши из группы контроля ( $\bullet$ ) получали ФБР по той же схеме, среднее $\pm$  SD, n = 3. Объем опухоли был нормализован на объем, измеренный в день 7. \* - статистически значимые отличия между лечеными и нелечеными опухолями Hela-SypHer2. Б – гистологические исследования леченых и нелеченых опухолей Hela-SypHer2, окрашивание гематоксилином и эозином. Зоны, обозначенные желтым квадратом на изображениях с меньшим увеличением (210 × 280 мкм, объектив ×20), представлены с большим увеличением (60 × 80 мкм, объектив ×40) справа. Масштабная линейка 100 мкм.

В опытной группе, спустя три дня после последнего введения цисплатина, наблюдались выраженные дистрофические изменения, включая обширную вакуоляризацию цитоплазмы, светлые увеличенные ядра или маленькие гиперхромные ядра неправильной формы, ядерный полиморфизм (рисунок 26Б). В некоторых клетках была обнаружена потеря целостности клеточных мембран, митозы детектировались только в 0,96% от общего количества клеток и только на периферии опухолевого узла. Количество апоптотических клеток было увеличено
по сравнению с контролем до 6,27%. Поскольку размер клеток в опытной группе был увеличен, число клеток в поле зрения было снижено в 3 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, химиотерапия цисплатином привела к торможению опухолевого роста и многочисленным клеточным изменениям в опухолевых ксенографтах.

До забора опухолевого материала была проведена in vivo регистрация сигнала сенсора на pH с помощью установки IVIS Spectrum как описано в разделе «Материалы и методы». Было выявлено, что отношение сигналов  $I_{500}/I_{430}$  выше в нелеченых опухолях по сравнению с лечеными (2,43 ± 0,38 и 1,21 ± 0,29, соответственно, p = 0.00001) (рисунок 27). Хотя определение pHc в абсолютных единицах для экспериментов *in vivo* в данном исследовании невозможно, можно с уверенностью говорить о значительном закислении цитоплазмы опухолевых клеток в результате лечения цисплатином.

Также на свежих криосрезах опухолей, экспрессирующих сенсор SypHer2, было выявлено соответствие областей со сниженным значением pHc опухолевой ткани, состоящей из живых, но дистрофически измененных опухолевых клеток. Эти наблюдения соотносятся с данными, полученными in vitro (рис. 23), согласно которым в живых неделящихся опухолевых клетках после длительного воздействия цисплатина наблюдается значительное закисление цитоплазмы.

Таким образом, в нашем исследовании in vitro динамика pHc была впервые прослежена в отдельных клетках на протяжении длительного времени, что позволило выявить отличия в динамике pHc для клеток с разным ответом на воздействие цисплатина. Длительный стабильный период защелачивания (~2 ч) наблюдался в клетках, чья пролиферация в результате воздействия цисплатина была снижена, но жизнеспособность сохранена, тогда как pHc в погибших клетках заметно колебался в течение этого периода. Ранее было показано, что в опухолевых клетках, устойчивых к цисплатину, pHc заметно повышен [2-4]. Одним из возможных механизмов защелачивания цитоплазмы клеток,

устойчивых к цисплатину, считается повышенная экспрессия вакуолярной АТФазы (V-ATPase). Было показано,



Рисунок 27. Распределение зон с различным значением pHc в опухоли in vivo и ех vivo в результате лечения цисплатином. (**A**) флуоресцентные изображения, полученные при возбуждении светом с длиной волны 430 и 500 нм (детекция на длине волны 540 нм); (**Б**) результирующее изображение SypHer2 I<sub>500</sub>/I<sub>430</sub> трех нелеченых (верхний ряд) и леченых (нижний ряд) опухолей (**B**) количественный анализ *in vivo*, chtlytt  $\pm$  SD, n = 3 tumors; (**Г**) результирующее изображение SypHer2 I<sub>500</sub>/I<sub>430</sub> свежих криосрезов. Масштабная линейка 100 мкм. Изображения были получены на 35 день опухолевого роста (спустя три дня после последнего введения цисплатина)

\*Статистически значимое отличие от контрольной группы,  $p \le 0.05$ .

что супрессия V-ATPase ведет к быстрому закислению цитоплазмы и существенному увеличению чувствительности к цисплатину *in vitro* [4, 5] и *in vivo* [6]. В целом, наши результаты подтверждают гипотезу о том, что способность клеток поддерживать более высокие значения pHc коррелирует с лучшей выживаемостью при воздействии цисплатина.

Кроме того, известны предположения о контроле апоптотических процессов посредством pHc: Защелачивание цитоплазмы - базовая особенность опухолевых

клеток, способствует уходу от апоптоза. В то время, как кислый pHc необходим для запуска апоптоза, в частности, для активации каспаз и эндонуклеаз и, вероятно, для экспрессии некоторых других участников апоптотического каскада [175, 176]. Хотя в настоящем исследовании мертвые клетки были определены без спецификации пути гибели, можно предположить, что вызванные цисплатином нарушения гомеостаза pHc, могли привести к гибели опухолевых клеток посредством апоптоза. Тогда сдвиг pHc в более щелочную сторону мог привести к избеганию апоптоза. Также было показано быстрое закисление цитоплазмы в течение 1 часа после добавления цисплатина во всех клетках, независимо от их ответа. Спустя 24 и 48 часов после воздействия цисплатина в живых клетках с угнетенной пролиферацией также наблюдался более кислый pHc.

Что касается динамики pHc в опухолевых клетках, формирующих сфероид, стоит отметить, что в клетках на периферии сфероидов она совпадала с динамикой pHc в клеточном монослое. Там же, на периферии сфероидов, наблюдалась и активная гибель клеток. В центре сфероида pHc дольше оставался повышенным (более щелочным), что, учитывая гипотезу о более шелочном pHc в резистентных клетках [2-4], подтверждает известные данные о том, что в центре сфероида клетки более устойчивы к химиотерапевтическим препаратам, в частности, к цисплатину [90]. Поскольку клетки с периферии сфероидов (где наблюдается закисление цитоплазмы, спустя 6 часов) практически все погибают к периоду наблюдения 24 часа, можно предположить, что оставшиеся клетки с повышенным pHc – это более устойчивые к воздействию цисплатина клетки центра сфероида.

Что касается опухолевых ксенографтов – то также, как и в клеточном монослое, на момент забора опухоли был зарегистрирован более кислый рНс по сравнению с контролем в живых клетках с угнетенной пролиферацией. Причины наблюдаемого закисления цитоплазмы еще предстоит уточнить. Возможно, это избыточных связано c ингибированием механизмов удаления протонов, цисплатином. Так. в исследовании Rebillard et al. было вызванным зарегистрировано быстрое снижение pHc на 0,05-0,1 в клетках HT29 в течение 15

минут после добавления препарата [177]. Авторы предполагают, что это связано с ингибирование NHE1, важного регулятора pHc, повышенная активность которого характерна для опухолевых клеток. Хотя механизм ингибирования NHE1 цисплатином пока не раскрыт, скорее всего, это не связано с накоплением ДНКаддуктов, образующихся при воздействии цисплатина. Позднее неконкурентное ингибирование NHE1 было подтверждено исследованиями Milosavljevic et al. [178]. Насколько нам известно, закисление цитозоля опухолевых клеток при лечении цисплатином *in vivo* было продемонстрировано нами впервые. Наличие же лечебного эффекта при патоморфологическом анализе и торможение роста опухолей позволяют заключить, что данное изменение pHc отражает лечебный эффект цисплатина и указывает на его эффективность.

## 3.5 Исследование динамики pH цитозоля опухолевых клеток с помощью генетически кодируемого сенсора SypHer2 при воздействии таксола in vitro и in vivo

При исследовании пролиферации и выживаемости клеток Hela-SypHer2 под влиянием таксола было показано заметное снижение пролиферативной активности относительно контроля (рисунок 28А), однако значимых отличий количества мертвых клеток в контрольной группе и группе с добавлением таксола выявлено не было (рисунок 28Б).

При анализе среднего значения pHc во всей популяции клеток была показана следующая динамика: резкое защелачивание в первые 40 минут до ~7,8 единиц с последующим плавным снижением pHc до 7,07±0,30 к 48 часам наблюдения (рисунок 29 А,Б). В контрольных клетках заметных изменений pHc не наблюдалось.



Рисунок 28. Влияние таксола на пролиферативную активность и выживаемость опухолевых клеток Hela-SypHer2. А – количество живых клеток Hela-SypHer2. Б – процент мертвых клеток (окрашенных трипановым синим).

\* - статистически значимое отличие клеток Hela-SypHer2, леченых таксолом, от нелеченых, р≤0,05

Так же, как и в случае с цисплатином была проанализирована динамика pHc в индивидуальных опухолевых клетках в ответ на лечение таксолом. Исходный рНс (до добавления препарата) во всех группах клеток был ~7,4 и не отличался для клеток с разным ответом на влияние таксола. Сразу после добавления таксола (через ~45 минут) наблюдалось резкое защелачивание цитоплазмы примерно на 0,2 единицы во всех группах клеток (рисунок 29), затем значения рНс снижались как в выживающих, так и в погибающих клетках. Однако при анализе динамики рН в отдельных клетках было показано, что в погибающих клетках имеется первый пик защелачивания через 40 минут после добавления препарата, а затем рНс постепенно и плавно снижается, при этом ранняя гибель клеток наблюдается на фоне повышенного уровня pHc относительно исходного (7,47±0,11 vs 7,29±0,10, p=0,028923) (рисунок 29Г) в выживающих же клетках нами было зарегистрировано как минимум еще 3 периода повышения внутриклеточного рНс и довольно быстрое его снижение (рисунок 29Д). Можно предположить, что системы регуляции рНс в более жизнеспособных клетках являются более лабильными и способны к быстрым перестроениям и наблюдается большая



Рисунок 29. Динамика pHc в опухолевых клетках Hela-SypHer2 при воздействии таксола. А – репрезентативные рациометрические изображения и окрашивание пропидиумом иодида спустя 24 часа (время после добавления таксола указано на каждом изображении, масштабная линейка 50 мкм). Б-динамика pHc, среднее по всем клеткам (n=50), В – критерий корреляции Пирсона между pHc и пролиферативной активностью (пролиферация представлена в % от контроля). Г – ранние изменения pHc в клетках, которые в последствие погибли Д- ранние изменения pHc в клетках, которые выжили,

\* - статистически значимое отличие от исходного pHc, p≤0,05

адаптация к кислым значениям pHc. Гибель же клеток на фоне повышенного pHc коррелирует с данными о Ca2+-зависимом апоптозе, наблюдающемся в опухолевых клетках при воздействии таксола [179](Pan et al., 2014). В других

независимых исследованиях на клетках Hela было показано, что выход ионов Ca2+ из эндоплазматического ретикулума происходит при повышении pHc [134, 180]. Основываясь на этих данных, мы можем предположить, что наблюдаемая в наших исследованиях гибель клеток может наступать в результате защелачивания цитоплазмы, вызванного таксолом.

В отличие от цисплатина была установлена корреляция между уровнем pHc и пролиферативной активностью, под воздействием таксола ( $r^2=0,966$ ) (рисунок 30В). Известно, что значения внутриклеточного pH в пределах 7,0-7,2 считаются оптимальными для деления клеток, а более щелочные значения (~0,3 единицы выше стандартного) активируют клеточную пролиферацию [72]. Также в отдельных статьях было показано, что снижение уровня внутриклеточного pH ведет к снижению клеточной пролиферации [181].

Полученные нами данные согласуются с литературными, что позволяет рассматривать уровень внутриклеточного pH в качестве возможного механизма снижения пролиферации опухолевых клеток и их гибели при воздействии таксола.

По аналогии с цисплатином было исследовано воздействие таксола на трехмерные опухолевые модели – опухолевые сфероиды.

Характер роста контрольных сфероидов описан в разделе 3.3. Что касается сфероидов, подверженных воздействию таксола, стоит отметить, что размер их существенно не менялся по сравнению с контрольной группой. Однако наблюдалось значимое увеличение числа мертвых клеток к 24 и 48 часам наблюдения, а также были заметны морфологические изменения, выражающиеся в нарушении целостности сфероидов (рисунок 30А). При этом большая часть мертвых слабо прикрепленных клеток была расположена на периферии сфероидов, что говорит о их высокой подверженности влиянию препарата.



Рисунок 30. Влияние таксола на опухолевые сфероиды. А – репрезентативные изображения опухолевых сфероидов в проходящем свете. Б – кривые роста контрольных сфероидов и сфероидов при воздействии цисплатина. В – двойное флуоресцентное окрашивание для выявления живых (кальцеин, зеленый цвет) и мертвых (пропидиума йодид, красный цвет) клеток. Г – количество мертвых клеток в опухолевых сфероидах.

масштабная линейка 200 мкм для всех изображений.

Изменения pHc под воздействием таксола в центре и на периферии сфероидов имели схожую динамику (рисунок 31). В первые 3 часа после добавления препарата наблюдалось заметное повышение значений pHc на ~0,2 единицы. Затем в течение 48 часов наблюдения pHc постепенно возвращался к исходным значениям (~ 7,2 pH единиц).



Рисунок 31. Динамика pHc в опухолевых сфероидах из клеток Hela-SypHer2 при воздействии таксола. А – карта распределения pHc в контрольных сфероидах и при воздействии таксола. Б – динамика pHc на периферии и в центре сфероидов, значения представлены в виде средних±SD, n=50.

масштабная линейка 200 мкм для всех изображений.

\* - статистически значимые отличия, р<0,05

Таким образом, при исследовании динамики рНс в ответ на добавление таксола нами было зарегистрировано длительное защелачивание цитоплазмы во всех клетках, независимо от их ответа на препарат и расположения в трехмерной структуре. Известно, что таксол имеет сложную структуру с кислотными и молекулы [182]. Данное основными доменами В составе вещество не ионизируется при физиологических условиях и, следовательно, не может изменения рН цитоплазмы, связанные с его поступлением и вызывать диссоциацией. Поскольку данные изменения наблюдались довольно рано после добавления таксола, то связь их с изменениями метаболизма также маловероятна, поскольку для метаболических изменений требуется время. Поскольку таксол является довольно крупной молекулой, то его транспортировка через клеточную мембрану требует участие молекул-переносчиков. Предполагается, что В

транспорте задействованы некоторые таксола органические анионтранспортирующие полипепдиды (OATPs), в частности OATP1B1 и OATP1B3 [183, 184]. В исследовании Martinez-Becerra и соавторов было высказано предположение, что транспорт через ОАТР1В1/ОАТР1В3 сопровождается электрогенным поступлением анионов (или выбросом катионов) [184]. А в исследованиях Leuthold и соавторов было показано, что транспорт через OATPs ведет к активации выведения бикарбоната и, как следствие, быстрому защелачиванию внутриклеточного пространства [185]. Также интересно, что максимальные значения pHc соответствовали времени максимального накопления таксола в опухолевых клетках (30-60 минут) согласно литературным данным [186]. Хотя точный механизм защелачивания цитоплазмы при воздействии таксола до конца не установлен, основываясь на данных о химии препарата и клеточном транспорте, мы предполагаем, что данный процесс может быть связан с транспортом посредством ОАТРѕ.

Резкое защелачивание после добавления препарата сопровождалось постепенным снижением pHc до или ниже исходных значений. Мы предполагаем, что это может быть связано либо с компенсаторной активацией механизмов поддержания гомеостаза pHc или ингибирующим воздействием таксола на NHE1, что было описано в работе Reshkin и соавторов [187].

На последнем этапе исследований было изучено изменение уровня внутриклеточного pH в опухолях Hela *in vivo* при воздействии таксола. Опухоли были получены и пролечены, как описано в разделе «Материалы и методы». В опытной группе 2 из 8 опухолей подверглись полной регрессии. Статистически значимые отличия нормализованных объемов опухолей наблюдались только на 14 день исследования (рисунок 32).

На 17/19 дни исследования, животных наркотизировали, флуоресцентный сигнал опухолей был исследован in vivo с помощью установки IVIS Spectrum и микроскопа LSM 880, затем опухоли были удалены и наплавлены на гистологическое исследование. По результатам гистологического исследования контрольные опухоли были представлены плотной тканью, состоящей из крупных

полиморфных клеток, плотно прилегающих друг к другу (рисунок 33Б). В крупных ядрах круглой или овальной формы визуализировался дисперсный хроматин. Базофильная цитоплазма была представлена тонким кольцом вокруг ядра. Митотическая активность клеток была высокая, опухолевые клетки формировали комплексы, окруженные прослойками соединительной ткани. Вокруг опухолевого узла наблюдался лимфоидноклеточный инфильтрат. В центре опухолевого узла имелись участки некроза. Опухоли в опытной группе отличались по качеству ответа на лечение, у двух опухолей из 6 не наблюдалось



Рисунок 32. Влияние таксола на опухоли Hela-SypHer2 у мышей. А – изменение объема опухолей в ответ на лечение таксолом ( $\circ$ ) в/б, 10 мг/кг, всего 6 введений в течение 2-х недель, начиная с 3-го дня опухолевого роста, мыши из группы контроля ( $\bullet$ ) получали ФБР по той же схеме, среднее $\pm$  SD, n = 3-8. Объем опухоли был нормализован на объем, измеренный в день 3. \* - статистически значимые отличия между лечеными и нелечеными опухолями Hela-SypHer2. Б – гистологические исследования леченых и нелеченых опухолей Hela-SypHer2, окрашивание гематоксилином и эозином. Зоны, обозначенные желтым квадратом на изображениях с меньшим увеличением (631 × 472 мкм, объектив ×20), представлены с большим увеличением (309 × 231 мкм, объектив ×40) справа. масштабная линейка 200 мкм –левая панель, 100 мкм – правая панель.

морфологического ответа на лечение – строение опухоли и уровень митотической активности соответствовали таковым в контрольных опухолях. На момент наблюдения цитоплазма большинства клеток находилась в состоянии отека вплоть до нарушения целостности клеточной мембраны. Отмечался ядерный полиморфизм: большинство ядер были уменьшены в размерах, наблюдалась конденсация хроматина, много сморщенных ядер с сильно конденсированным хроматином. В опухолевом узле наблюдались обширные поля некроза. Также было отмечено большое количество вновь образованной соединительной ткани, которая врастает глубоко в опухолевый узел вплоть до полей некроза, замещая отмирающую опухолевую ткань.

В опытной группе во всех опухолях с морфологическим ответом на лечение, кроме одной наблюдалось снижение митотической активности, в одной опухоли наблюдались обширные очаги некроза, разрастание соединительной ткани и участки опухолевой ткани с высокой митотической активностью.

Таким образом, химиотерапия таксолом сопровождалась лечебным эффектом и многочисленным клеточными изменениям в опухолевых ксенографтах.

Анализ флуоресценции сенсора SypHer2 *in vivo* был проведен, как описано в разделе «Материалы и методы» с помощью установок IVIS Spectrum для регистрации поверхностной флуоресценции и микроскопа LSM880 для получения изображений При С клеточным разрешением. анализе опухолей, экспрессирующих сенсор SypHer2, с помощью установки IVIS Spectrum было выявлено некоторое снижение величины отношения сигналов I<sub>500</sub>/I<sub>430</sub> в леченых опухолях по сравнению с нелечеными (1,39±0,15 и 1,99±0,31, соответственно, p=0,08) (рисунок 33). По данным, полученным с помощью LSM880, усредненное отношение сигналов I<sub>500</sub>/I<sub>430</sub> было несколько ниже, чем в контроле, но статистически не значимо  $(0,43 \pm 0,10 \text{ и } 0,32 \pm 0,05)$ , соответственно, p = 0,66). Таким образом, в результате in vivo исследований явных изменений уровня внутриклеточного рН в опухолях в результате лечения таксолом не было выявлено. Однако можно отметить тенденцию к закислению внутриклеточного

пространства опухолевых клеток в результате ответа на лечение таксолом, что согласуется с данными in vitro, когда в результате длительного воздействия (до 48 часов) таксола также наблюдалось закисление цитоплазмы.

Влияние таксола на опухолевые клетки исследуется на протяжении многих лет. Так, в работе Reshkin и соавторов показано, что воздействие таксола ведет к инактивации Na/H+ обменника (NHE1) в клетках меланомы и повышению количества апоптотических клеток. Также в работе Amith и соавторов показано, ингибиторов что комбинация таксола и NHE1 снижает выживаемость, миграционную и инвазивную способности клеток рака молочной железы. Однако в данных работах не проанализированы изменения внутриклеточного рН опухолевых клеток, хотя известно, что основная функция NHE1 – это выведение H+ количества И его инактивация ведет к избыточного закислению внутриклеточного пространства [70, 187]. Также в работе Нои и соавторов что совместное применение ингибиторов монокарбоксилатных показано. транспортеров (МСТ1) и таксола повышает эффективность лечения рака молочной железы in vitro и in vivo в сравнении с монорежимами. В работе показано, что ингибирование МСТ1 ведет к повышению уровня лактата внутри снижению его клетки И выведения BO внеклеточное пространство И высказываются предположения по поводу токсического воздействия самого лактата на опухолевые клетки [188].



Рисунок 33. Распределение зон с различным значением pHc в опухоли in vivo в результате лечения таксолом. (А) Результирующее изображение SypHer2  $I_{500}/I_{430}$  леченых и нелеченых опухолей, поверхностный флуоресцентный имиджинг; (Б) Результирующее изображение SypHer2  $I_{500}/I_{430}$  леченых и нелеченых опухолей, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, масштабная линейка 50 мкм. (В) количественный анализ  $I_{500}/I_{430}$  in vivo для поверхностного флуоресцентного имиджинга, среднее ± SD, n = 4 опухоли; (Г) количественный анализ  $I_{500}/I_{430}$  in vivo для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Изображения были получены на 17/19 день опухолевого роста

Однако известно, что MCT1 совместно с лактатом транспортирует и H+, при этом транспорт может идти в обоих направлениях в зависимости от концентрации лактата и протонов [189], следовательно, ингибирование MCT1, сопровождающееся повышением концентрации лактата в цитозоли ведет к накоплению H+ и закислению внутриклеточного пространства.

Тем не менее в другой работе было показано, что ингибирование βинтегринов ингибирует апоптоз, вызванный таксолом, в клетках РМЖ [190]. Это важно, посколько известно, что, в свою очередь, β-интегрины стимулируют NHE, повышая уровень внутриклеточного pH [191]. Также в литературе имеются данные данными о Ca2+-зависимом апоптозе, наблюдающемся в опухолевых клетках при воздействии таксола, [179] пусковым механизмом которого может являться повышенный pH [180].

Что касается основного терапевтического действия таксола полимеризации микротрубочек и ареста клеточного цикла, известно, что стабилизация микротрубочек таксолом активнее идет в кислой среде, а при повышении pH комплексы таксол-микротрубочки могут частично распадаться [192].

Полученные нами данные подтверждают, что снижение пролиферации протекает на фоне понижения значений pHc, по-видимому, за счет ингибирование NHE, опсанного в работе [187]. Гибель же опухолевых клеток при воздействии таксола является более комплексным процессом, в которым может быть задействовано повышение внутриклеточного pH. Данное предположение требует дальнейших исследований и открывает перспективу повышения эффективности терапии таксолом за счет модификации pH цитоплазмы опухолевых клеток по нестандартной методике.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени накоплено большое количество данных о роли внеи внутриклеточного pH опухолевой ткани в активации пролиферации, инвазии опухолевых клеток, а также в процессе формирования множественной лекарственной устойчивости. При этом большая часть данных относится к исследованиям внеклеточного pH, поскольку изучение внутриклеточного водородного показателя (pHc) ограничено техническими сложностями.

В данной работе нами впервые предложен метод оценки внутриклеточного водородного показателя на основе нового флуоресцентного генетическикодируемого белка SypHer2 и методов флуоресцентного биоимиджинга как в исследованиях *in vitro*, так и в исследованиях *in vivo*. Также была разработана методика количественной оценки полученных данных. Показания сенсора SypHer2 были откалиброваны, что позволило получить абсолютные значения pH при проведении исследований *in vitro* как на клеточном монослое, так и на трехмерных опухолевых моделях, многоклеточных сфероидах.

С помощью сенсора SypHer2 было установлено, что pHc клеток аденокарциномы шейки матки Hela Kyoto составил 7,35±0,1, что хорошо согласуется с литературными данными. Впервые с помощью генетически кодируемого флуоресцентного сенсора был проведен мониторинг изменения pHc в процессе роста сфероида. Было установлено, что к 7-му дню роста опухолевого сфероида в нем формируются зоны с разными значения pHc на периферии и в центре: более кислое значение pHc (7,23 ± 0,06), а на периферии – более щелочное (7,32 ± 0,06). Наличие зон с разними значениями внутриклеточного pH также было показано в работе Evans et.al.

Впервые в данной работе было прослежено изменение pHc *in vivo* прижизненно при формировании опухоли путем подкожной инъекции клеток Hela Kyoto, экспрессирующих сенсор SypHer2. Было выявлено увеличение площади зон с высоким сигналом сенсора, соответствующим более щелочному значению внутриклеточного pH, с ростом опухоли. Опухоль имела гетерогенное строение,

при этом распределение зон отдельного опухолевого узла соответствовало таковому в многоклеточном опухолевом сфероиде.

Данные, полученные *in vivo* были сопоставлены с анализом *ex vivo* препаратов и иммуногистохимическими данными о содержании кислорода в ткани. Методика для анализа *ex vivo* препаратов была предложена в рамках данной работы. В результате сопоставления было показано, что зоны с максимально щелочным значение pHc соответствуют зонам гипоксии и некроза.

Поскольку в литературе большое внимание уделяется роли взаимодействия опухолевых и стромальных клеток в процессе формирования опухоли, в настоящей работе впервые были проведены динамические наблюдения изменения pHc в сокультуре опухолевых и стромальных клеток (фибробластах) с помощью генетически кодируемого сенсора SypHer2. Было показано достоверное снижение значения pHc опухолевых клеток на протяжении всего периода культивирования. При этом в фибробластах в условиях сокультивирования с опухолевыми клетками наблюдались достоверно более высокие значения pHc относительно фибробластов в условиях монокультуры.

Таким образом, полученные нами результаты анализа естественного роста опухоли и моделирования данного процесса *in vitro* расширяют понимание механизма формирования опухоли и вносят вклад в фундаментальные исследования биологии опухолей.

Впервые в данной работе были проведены динамические наблюдения изменения внутриклеточного уровня pH при воздействии химиотерапевтических препаратов цисплатин и таксол на двумерных и трехмерных клеточных культурах, а также *in vivo*.

Будучи генетически кодируемым, сенсор SypHer2 позволил наблюдать pHc в отдельных клетках в течение длительного периода наблюдения. Благодаря этой возможности, было установлено, что при воздействии цисплатина динамика pHc отражает ответ опухолевой клетки на терапию. Так, было показано, что не погибшие клетки со сниженной пролиферативной активностью принципиально отличались от погибших клеток способностью к длительному поддержанию более

щелочного уровня pHc в присутствии цисплатина. Сходная динамика наблюдалась на периферии опухолевых сфероидов, в центре же сфероидов pHc дольше оставался повышенным (более щелочным) и количество погибших клеток было ниже. В целом, наши результаты подтверждают гипотезу о том, что способность клеток поддерживать более высокие значения pHc коррелирует с лучшей выживаемостью при воздействии цисплатина. При этом корреляция между уровнем pHc и пролиферативной активностью, изменения которых, были вызваны воздействием цисплатина, в нашем исследовании не была установлена, хотя колебания pHc считаются важным фактором для контроля пролиферативной активности клеток [174].

Впервые продемонстрировано нами было закисление цитоплазмы опухолевых клеток при лечении цисплатином *in vivo*. При этом наблюдалось торможение роста опухолей И был выявлен лечебный эффект при патоморфологическом анализе. Следовательно, можно предположить, что данное изменение pHc отражает лечебный эффект цисплатина и указывает на его эффективность.

В отличие от цисплатина была установлена корреляция между уровнем pHc и пролиферативной активностью, под воздействием таксола. Поскольку известно, что более кислый pHc ведет к снижению пролиферативной активности, можно предположить, что модификация уровня внутриклеточного pH, возникающая в ответ на воздействие таксола, является одним из механизмов действия данного препарата.

Однако при воздействии таксола не были обнаружены отличие в динамике pHc среди групп клеток с разным ответом на лекарственное воздействие. В экспериментах *in vitro* как на двумерных, так и на трехмерных клеточных моделях, во всех клетках наблюдалось сначала резкое защелачивание цитоплазмы с последующим снижением уровня pHc до исходных значений или ниже. В экспериментах и *in vivo*.статистически значимых изменений pHc опухолевых клеток при воздействии таксола установлено не было, однако можно отметить тенденцию к закислению внутриклеточного пространства опухолевых клеток в результате ответа на лечение таксолом

Таким образом, с помощью предложенных нами методов оценки внутриклеточного рН впервые была прослежена его динамика при росте и формировании опухоли как *in vitro* так и *in vivo*, проведен анализ распределения зон с разным уровнем рНс в пределах одной опухоли. Также была проанализирована динамика изменения рНс опухолевых и стромальных клеток (фибробластов) при их взаимодействии. Зарегистрирована динамика изменения рНс опухолевых клеток при воздействии препаратов цисплатин и таксол, при этом особенности генетически кодируемого сенсора позволили провести продолжительные наблюдения в отдельных живых клетках, в результате были получены принципиально новые данные о реакции опухолевых клеток на терапию.

Полученные расширяют данные понятие механизма возникновения опухоли, имеют фундаментальное значение, могут быть включены В соответствующие разделы спецкурсов и лекций по биологии опухолевого роста. Кроме того, полученные данные могут стать основой для разработки новых подходов к лечению на основе коррекции уровня внутриклеточного рН.

## выводы

1. Разработаны методики регистрации внутриклеточного (цитоплазматического) рНс с использованием генетически кодируемого сенсора SypHer2 и систем флуоресцентного имиджинга в опухолевых клетках на моделях с различной организацией: клеточный монослой, опухолевые сфероиды, подкожные опухоли мышей. Показано, что pHc клеток HeLa Kyoto в монослое in vitro составляет  $7,35\pm0,10.$ В опухолевых сфероидах зарегистрированы статистически значимые отличия pHc опухолевых клеток в центре узла и на периферии: 7,23±0,06 и 7,43±0,06, соответственно, p=0,00000. В опухолях животных оценка pHc возможна по соотношению интенсивностей флуоресценции сенсора.

2. При сокультивировании опухолевых клеток HeLa с фибробластами показаны разнонаправленные изменения pHc в опухолевых клетках и фибробластах. В опухолевых клетках в сокультуре на протяжении 5 дней pHc в среднем был ниже на 0,1 единицы, а в фибробластах выше на 0,1 единицы относительно соответствующей монокультуры.

3. При естественном росте опухоли HeLa у мышей in vivo показано постепенное повышение внутриклеточного уровня pH по мере роста опухоли и выявлено наличие зон с разными значениями pHc опухолевых клеток. Ex vivo подтверждено, что зоны с высоким уровнем pHc соответствуют зонам гипоксии.

4. При мониторинге pHc в клеточном монослое HeLa при воздействии цисплатина в выживающих клетках выявлен период защелачивания с 7,29±0,02 до 7,6±0,07 длительностью до 3 часов. В клетках с дистрофическими изменениями на фоне лечения pHc снижался до 7,19±0,07 к 24 часам наблюдения. В сфероидах наблюдается стабильное защелачивание в центре до 24 часов наблюдения. In vivo в опухолях мышей при воздействии цисплатина сигнал сенсора (I500/I405) снижался с 2,43±0,38 до 1,21±0,29, p=0,00001, что указывает на закисление.

5. При мониторинге pHc в клеточном монослое HeLa при воздействии таксола в выживающих клетках выявлено постепенное закисление с 7,36±0,03 до

максимум 7,07±0,30 (p=0,00000) к 48 часам наблюдения. Ранняя гибель клеток наблюдалась на фоне увеличения pHc до 7,47±0,11 относительно исходного 7,29±0,10, p=0,028923. Показана корреляция снижения пролиферации и снижения pHc при воздействии таксола (R2=0,9659). В сфероидах наблюдается стабильное защелачивание как в центре, так и на периферии до 24 часов наблюдения. В экспериментах in vivo при лечении таксолом наблюдалась тенденция к снижению pHc в опухолях на фоне ингибирования опухолевого роста, что согласуется с данными in vitro.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Rauch, C. On the relationship between drug's size, cell membrane mechanical properties and high levels of multi drug resistance: a comparison to published data / C. Rauch // Eur Biophys J. 2009. Vol. 38, N. 4. P. 537-46.
- 2. Huang, Z. The change of intracellular pH is involved in the cisplatin-resistance of human lung adenocarcinoma A549/DDP cells / Z. Huang, Y. Huang // Cancer Invest. 2005. Vol. 23, N. 1. P. 26-32.
- Chau, Q. Cisplatin efflux, binding and intracellular pH in the HTB56 human lung adenocarcinoma cell line and the E-8/0.7 cisplatin-resistant variant / Q. Chau, D.J. Stewart // Cancer Chemother Pharmacol. – 1999. – Vol. 44, N. 3. – P. 193-202.
- Murakami, T. Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular PH in cisplatin resistance / T. Murakami, I. Shibuya, T. Ise, Z.S. Chen, S. Akiyama, M. Nakagawa, H. Izumi, T. Nakamura, K. Matsuo, Y. Yamada, K. Kohno // Int J Cancer. – 2001. – Vol. 93, N. 6. – P. 869-74.
- Kulshrestha, A. Selective inhibition of tumor cell associated Vacuolar-ATPase 'a2' isoform overcomes cisplatin resistance in ovarian cancer cells / A. Kulshrestha, G.K. Katara, J. Ginter, S. Pamarthy, S.A. Ibrahim, M.K. Jaiswal, C. Sandulescu, R. Periakaruppan, J. Dolan, A. Gilman-Sachs, K.D. Beaman // Mol Oncol. – 2016. – Vol. 10, N. 6. – P. 789-805.
- Luciani, F. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs / F. Luciani, M. Spada, A. De Milito, A. Molinari, L. Rivoltini, A. Montinaro, M. Marra, L. Lugini, M. Logozzi, F. Lozupone, C. Federici, E. Iessi, G. Parmiani, G. Arancia, F. Belardelli, S. Fais // J Natl Cancer Inst. – 2004. – Vol. 96, N. 22. – P. 1702-13.
- 7. Рапопорт С.И., pH-метрия пищевода и желудка при заболеваниях верхних отделов пищеварительного тракта / Л.А.А. Рапопорт С.И., Ракитин Б.В., Трифонов М.М. . Москва: ИД Медпрктика-М, 2005оf.
- 8. Вдовина Н.В. Организм человека: процессы жизнеждеятельности и их регуляция / В. Н.В. Москва: Юрайт, 2019of.
- Putnam, Robert W Chapter 17 Intracellular pH Regulation / R.W. Putnam // In: Cell Physiology Source Book (Fourth Edition) / Edited by N. Sperelakis. – San Diego: Academic Press, 2012. – P. 303-321.
- Casey, J. R. Sensors and regulators of intracellular pH / J.R. Casey, S. Grinstein, J. Orlowski // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2010. – Vol. 11, N. 1. – P. 50-61.
- 11. Song, Chang Influence of Tumor pH on Therapeutic Response / C. Song, R. Griffin, H. Park // In: Edited by 2006. P. 21-42.
- Stock, C. Roles of pH and the Na(+)/H(+) exchanger NHE1 in cancer: From cell biology and animal models to an emerging translational perspective? / C. Stock, S.F. Pedersen // Semin Cancer Biol. 2017. Vol. 43. P. 5-16.

- Swietach, P. The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer / P. Swietach, R.D. Vaughan-Jones, A.L. Harris, A. Hulikova // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2014. – Vol. 369, N. 1638. – P. 20130099.
- Parks, S. K. Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy / S.K. Parks, J. Chiche, J. Pouysségur // Nat Rev Cancer. – 2013. – Vol. 13, N. 9. – P. 611-23.
- Aronson, P. S. Modifier role of internal H+ in activating the Na+-H+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles / P.S. Aronson, J. Nee, M.A. Suhm // Nature. – 1982. – Vol. 299, N. 5879. – P. 161-3.
- Fuster, Steady-state function of the ubiquitous mammalian Na/H exchanger (NHE1) in relation to dimer coupling models with 2Na/2H stoichiometry / D. Fuster, O.W. Moe, D.W. Hilgemann // The Journal of general physiology. – 2008. – Vol. 132, N. 4. – P. 465-480.
- Reshkin, S. J. Na+-H+ exchanger, pH regulation and cancer / S.J. Reshkin, R.A. Cardone, S. Harguindey // Recent Pat Anticancer Drug Discov. – 2013. – Vol. 8, N. 1. – P. 85-99.
- Reshkin, S. J. Na+/H+ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes / S.J. Reshkin, A. Bellizzi, S. Caldeira, V. Albarani, I. Malanchi, M. Poignee, M. Alunni-Fabbroni, V. Casavola, M. Tommasino // Faseb j. 2000. Vol. 14, N. 14. P. 2185-97.
- Cardone, R. A. The role of disturbed pH dynamics and the Na+/H+ exchanger in metastasis / R.A. Cardone, V. Casavola, S.J. Reshkin // Nat Rev Cancer. 2005. Vol. 5, N. 10. P. 786-95.
- Alfarouk, K. O. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question / K.O. Alfarouk, D. Verduzco, C. Rauch, A.K. Muddathir, H.H. Adil, G.O. Elhassan, M.E. Ibrahim, J. David Polo Orozco, R.A. Cardone, S.J. Reshkin, S. Harguindey // Oncoscience. – 2014. – Vol. 1, N. 12. – P. 777-802.
- 21. White, K. A. Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance / K.A. White, B.K. Grillo-Hill, D.L. Barber // J Cell Sci. 2017. Vol. 130, N. 4. P. 663-669.
- 22. Boedtkjer, E. Physiology, pharmacology and pathophysiology of the pH regulatory transport proteins NHE1 and NBCn1: similarities, differences, and implications for cancer therapy / E. Boedtkjer, L. Bunch, S.F. Pedersen // Curr Pharm Des. 2012. Vol. 18, N. 10. P. 1345-71.
- 23. Swietach, P. What is pH regulation, and why do cancer cells need it? / P. Swietach // Cancer Metastasis Rev. 2019. Vol. 38, N. 1-2. P. 5-15.
- Robergs, R. A. Lactate, not Lactic Acid, is Produced by Cellular Cytosolic Energy Catabolism / R.A. Robergs, C.R. McNulty, G.M. Minett, J. Holland, G. Trajano // Physiology (Bethesda). – 2018. – Vol. 33, N. 1. – P. 10-12.
- 25. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // Cell. 2011. Vol. 144, N. 5. P. 646-74.

- 26. Hanahan, D. The hallmarks of cancer / D. Hanahan, R.A. Weinberg // Cell. 2000. Vol. 100, N. 1. P. 57-70.
- Peak, M. Regulation of glycogen synthesis and glycolysis by insulin, pH and cell volume. Interactions between swelling and alkalinization in mediating the effects of insulin / M. Peak, M. al-Habori, L. Agius // Biochem J. 1992. Vol. 282 (Pt 3), N. Pt 3. P. 797-805.
- Miccoli, L. Intracellular pH governs the subcellular distribution of hexokinase in a glioma cell line / L. Miccoli, S. Oudard, F. Sureau, F. Poirson, B. Dutrillaux, M.F. Poupon // The Biochemical journal. – 1996. – Vol. 313 (Pt 3), N. Pt 3. – P. 957-962.
- 29. Dechant, R. Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-ATPase / R. Dechant, M. Binda, S.S. Lee, S. Pelet, J. Winderickx, M. Peter // Embo j. 2010. Vol. 29, N. 15. P. 2515-26.
- Dietl, K. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes / K. Dietl, K. Renner, K. Dettmer, B. Timischl, K. Eberhart, C. Dorn, C. Hellerbrand, M. Kastenberger, L.A. Kunz-Schughart, P.J. Oefner, R. Andreesen, E. Gottfried, M.P. Kreutz // J Immunol. – 2010. – Vol. 184, N. 3. – P. 1200-9.
- 31. Damaghi, M. pH sensing and regulation in cancer / M. Damaghi, J.W. Wojtkowiak, R.J. Gillies // Front Physiol. 2013. Vol. 4. P. 370.
- 32. Fantin, V. R. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance / V.R. Fantin, J. St-Pierre, P. Leder // Cancer Cell. 2006. Vol. 9, N. 6. P. 425-34.
- 33. Le, A. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression / A. Le, C.R. Cooper, A.M. Gouw, R. Dinavahi, A. Maitra, L.M. Deck, R.E. Royer, D.L. Vander Jagt, G.L. Semenza, C.V. Dang // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – Vol. 107, N. 5. – P. 2037-42.
- Xie, J. Beyond Warburg effect--dual metabolic nature of cancer cells / J. Xie, H. Wu, C. Dai, Q. Pan, Z. Ding, D. Hu, B. Ji, Y. Luo, X. Hu // Sci Rep. 2014. Vol. 4. P. 4927.
- Zhao, Di Lysine-5 acetylation negatively regulates lactate dehydrogenase A and is decreased in pancreatic cancer / D. Zhao, S.-W. Zou, Y. Liu, X. Zhou, Y. Mo, P. Wang, Y.-H. Xu, B. Dong, Y. Xiong, Q.-Y. Lei, K.-L. Guan // Cancer cell. – 2013. – Vol. 23, N. 4. – P. 464-476.
- Read, J. A. Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase / J.A. Read, V.J. Winter, C.M. Eszes, R.B. Sessions, R.L. Brady // Proteins. – 2001. – Vol. 43, N. 2. – P. 175-85.
- Isom, D. G. Protons as second messenger regulators of G protein signaling / D.G. Isom, V. Sridharan, R. Baker, S.T. Clement, D.M. Smalley, H.G. Dohlman // Mol Cell. – 2013. – Vol. 51, N. 4. – P. 531-8.
- Trivedi, B. Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase / B. Trivedi, W.H. Danforth // J Biol Chem. – 1966. – Vol. 241, N. 17. – P. 4110-2.

- 39. Frieden, C. Phosphofructokinase. III. Correlation of the regulatory kinetic and molecular properties of the rabbit muscle enzyme / C. Frieden, H.R. Gilbert, P.E. Bock // J Biol Chem. 1976. Vol. 251, N. 18. P. 5644-7.
- Andrés, V. Regulation of muscle phosphofructokinase by physiological concentrations of bisphosphorylated hexoses: effect of alkalinization / V. Andrés, J. Carreras, R. Cussó // Biochem Biophys Res Commun. 1990. Vol. 172, N. 1. P. 328-34.
- Moreno-Sánchez, R. Phosphofructokinase type 1 kinetics, isoform expression, and gene polymorphisms in cancer cells / R. Moreno-Sánchez, A. Marín-Hernández, J.C. Gallardo-Pérez, H. Quezada, R. Encalada, S. Rodríguez-Enríquez, E. Saavedra // J Cell Biochem. – 2012. – Vol. 113, N. 5. – P. 1692-703.
- 42. Yi, W. Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism / W. Yi, P.M. Clark, D.E. Mason, M.C. Keenan, C. Hill, W.A. Goddard, 3rd, E.C. Peters, E.M. Driggers, L.C. Hsieh-Wilson // Science. 2012. Vol. 337, N. 6097. P. 975-80.
- Webb, B. A. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression / B.A. Webb, M. Chimenti, M.P. Jacobson, D.L. Barber // Nat Rev Cancer. 2011. Vol. 11, N. 9. P. 671-7.
- 44. Webb, B. A. Structures of human phosphofructokinase-1 and atomic basis of cancer-associated mutations / B.A. Webb, F. Forouhar, F.E. Szu, J. Seetharaman, L. Tong, D.L. Barber // Nature. 2015. Vol. 523, N. 7558. P. 111-4.
- 45. Putney, L. K. Expression profile of genes regulated by activity of the Na-H exchanger NHE1 / L.K. Putney, D.L. Barber // BMC Genomics. 2004. Vol. 5, N. 1. P. 46.
- 46. Choi, C. H. Expression of actin-interacting protein 1 suppresses impaired chemotaxis of Dictyostelium cells lacking the Na+-H+ exchanger NHE1 / C.H. Choi, H. Patel, D.L. Barber // Mol Biol Cell. – 2010. – Vol. 21, N. 18. – P. 3162-70.
- 47. Frantz, C. Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding / C. Frantz, G. Barreiro, L. Dominguez, X. Chen, R. Eddy, J. Condeelis, M.J. Kelly, M.P. Jacobson, D.L. Barber // J Cell Biol. 2008. Vol. 183, N. 5. P. 865-79.
- 48. Clement, D. L. PDGFRα signaling in the primary cilium regulates NHE1dependent fibroblast migration via coordinated differential activity of MEK1/2-ERK1/2-p90RSK and AKT signaling pathways / D.L. Clement, S. Mally, C. Stock, M. Lethan, P. Satir, A. Schwab, S.F. Pedersen, S.T. Christensen // J Cell Sci. – 2013. – Vol. 126, N. Pt 4. – P. 953-65.
- 49. Denker, S. P. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1 / S.P. Denker, D.L. Barber // J Cell Biol. 2002. Vol. 159, N. 6. P. 1087-96.
- Meima, M. E. The sodium-hydrogen exchanger NHE1 is an Akt substrate necessary for actin filament reorganization by growth factors / M.E. Meima, B.A. Webb, H.E. Witkowska, D.L. Barber // J Biol Chem. – 2009. – Vol. 284, N. 39. – P. 26666-75.

- 51. Stock, C. Protons make tumor cells move like clockwork / C. Stock, A. Schwab // Pflugers Arch. 2009. Vol. 458, N. 5. P. 981-92.
- Stock, C. Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na+/H+ exchange / C. Stock, B. Gassner, C.R. Hauck, H. Arnold, S. Mally, J.A. Eble, P. Dieterich, A. Schwab // J Physiol. – 2005. – Vol. 567, N. Pt 1. – P. 225-38.
- Estrella, V. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion / V. Estrella, T. Chen, M. Lloyd, J. Wojtkowiak, H.H. Cornnell, A. Ibrahim-Hashim, K. Bailey, Y. Balagurunathan, J.M. Rothberg, B.F. Sloane, J. Johnson, R.A. Gatenby, R.J. Gillies // Cancer Res. – 2013. – Vol. 73, N. 5. – P. 1524-35.
- 54. Brown, G. T. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis / G.T. Brown, G.I. Murray // J Pathol. 2015. Vol. 237, N. 3. P. 273-81.
- 55. Yamamoto, K. Extracellular regulation of metalloproteinases / K. Yamamoto, G. Murphy, L. Troeberg // Matrix Biol. 2015. Vol. 44-46. P. 255-63.
- Greco, M. R. Protease activity at invadopodial focal digestive areas is dependent on NHE1-driven acidic pHe / M.R. Greco, E. Antelmi, G. Busco, L. Guerra, R. Rubino, V. Casavola, S.J. Reshkin, R.A. Cardone // Oncol Rep. – 2014. – Vol. 31, N. 2. – P. 940-6.
- 57. Lin, Y. NHE1 mediates migration and invasion of HeLa cells via regulating the expression and localization of MT1-MMP / Y. Lin, J. Wang, W. Jin, L. Wang, H. Li, L. Ma, Q. Li, T. Pang // Cell Biochem Funct. 2012. Vol. 30, N. 1. P. 41-6.
- 58. Lauritzen, G. The Na+/H+ exchanger NHE1, but not the Na+, HCO3(-) cotransporter NBCn1, regulates motility of MCF7 breast cancer cells expressing constitutively active ErbB2 / G. Lauritzen, C.M. Stock, J. Lemaire, S.F. Lund, M.F. Jensen, B. Damsgaard, K.S. Petersen, M. Wiwel, L. Rønnov-Jessen, A. Schwab, S.F. Pedersen // Cancer Lett. 2012. Vol. 317, N. 2. P. 172-83.
- 59. Cong, D. Upregulation of NHE1 protein expression enables glioblastoma cells to escape TMZ-mediated toxicity via increased H<sup>+</sup> extrusion, cell migration and survival / D. Cong, W. Zhu, Y. Shi, K.B. Pointer, P.A. Clark, H. Shen, J.S. Kuo, S. Hu, D. Sun // Carcinogenesis. 2014. Vol. 35, N. 9. P. 2014-24.
- De Saedeleer, C. J. Glucose deprivation increases monocarboxylate transporter 1 (MCT1) expression and MCT1-dependent tumor cell migration / C.J. De Saedeleer, P.E. Porporato, T. Copetti, J. Pérez-Escuredo, V.L. Payen, L. Brisson, O. Feron, P. Sonveaux // Oncogene. – 2014. – Vol. 33, N. 31. – P. 4060-8.
- 61. Grillo-Hill, B. K. Increased H<sup>+</sup> efflux is sufficient to induce dysplasia and necessary for viability with oncogene expression / B.K. Grillo-Hill, C. Choi, M. Jimenez-Vidal, D.L. Barber // Elife. 2015. Vol. 4.
- 62. Srivastava, J. Structural model and functional significance of pH-dependent talinactin binding for focal adhesion remodeling / J. Srivastava, G. Barreiro, S. Groscurth, A.R. Gingras, B.T. Goult, D.R. Critchley, M.J. Kelly, M.P. Jacobson,

D.L. Barber // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2008. – Vol. 105, N. 38. – P. 14436-41.

- 63. Parks, S. K. The Na(+)/HCO3(-) Co-Transporter SLC4A4 Plays a Role in Growth and Migration of Colon and Breast Cancer Cells / S.K. Parks, J. Pouyssegur // J Cell Physiol. 2015. Vol. 230, N. 8. P. 1954-63.
- 64. Frantz, C. Positive feedback between Cdc42 activity and H+ efflux by the Na-H exchanger NHE1 for polarity of migrating cells / C. Frantz, A. Karydis, P. Nalbant, K.M. Hahn, D.L. Barber // J Cell Biol. 2007. Vol. 179, N. 3. P. 403-10.
- Pope, B. J. Solution structure of human cofilin: actin binding, pH sensitivity, and relationship to actin-depolymerizing factor / B.J. Pope, K.M. Zierler-Gould, R. Kühne, A.G. Weeds, L.J. Ball // J Biol Chem. – 2004. – Vol. 279, N. 6. – P. 4840-8.
- 66. Gorbatyuk, V. Y. Mapping the phosphoinositide-binding site on chick cofilin explains how PIP2 regulates the cofilin-actin interaction / V.Y. Gorbatyuk, N.J. Nosworthy, S.A. Robson, N.P. Bains, M.W. Maciejewski, C.G. Dos Remedios, G.F. King // Mol Cell. 2006. Vol. 24, N. 4. P. 511-22.
- 67. Gingras, A. R. The structure of the C-terminal actin-binding domain of talin / A.R. Gingras, N. Bate, B.T. Goult, L. Hazelwood, I. Canestrelli, J.G. Grossmann, H. Liu, N.S. Putz, G.C. Roberts, N. Volkmann, D. Hanein, I.L. Barsukov, D.R. Critchley // Embo j. 2008. Vol. 27, N. 2. P. 458-69.
- Choi, C. H. pH sensing by FAK-His58 regulates focal adhesion remodeling / C.H. Choi, B.A. Webb, M.S. Chimenti, M.P. Jacobson, D.L. Barber // J Cell Biol. - 2013. - Vol. 202, N. 6. - P. 849-59.
- ulzmaier, F. J. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications / F.J. Sulzmaier, C. Jean, D.D. Schlaepfer // Nat Rev Cancer. – 2014. – Vol. 14, N. 9. – P. 598-610.
- Amith, S. R. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) as a novel co-adjuvant target in paclitaxel therapy of triple-negative breast cancer cells / S.R. Amith, J.M. Wilkinson, S. Baksh, L. Fliegel // Oncotarget. 2015. Vol. 6, N. 2. P. 1262-75.
- 71. Amith, S. R. KR-33028, a potent inhibitor of the Na(+)/H(+) exchanger NHE1, suppresses metastatic potential of triple-negative breast cancer cells / S.R. Amith, J.M. Wilkinson, L. Fliegel // Biochem Pharmacol. 2016. Vol. 118. P. 31-39.
- Flinck, M. Roles of pH in control of cell proliferation / M. Flinck, S.H. Kramer, S.F. Pedersen // Acta Physiol (Oxf). – 2018. – Vol. 223, N. 3. – P. e13068.
- 73. Pouysségur, J. Cytoplasmic pH, a key determinant of growth factor-induced DNA synthesis in quiescent fibroblasts / J. Pouysségur, A. Franchi, G. L'Allemain, S. Paris // FEBS Lett. 1985. Vol. 190, N. 1. P. 115-9.
- 74. Moolenaar, W. H. Effects of growth factors on intracellular pH regulation / W.H. Moolenaar // Annu Rev Physiol. 1986. Vol. 48. P. 363-76.
- 75. Kapus, A. A pH-sensitive and voltage-dependent proton conductance in the plasma membrane of macrophages / A. Kapus, R. Romanek, A.Y. Qu, O.D. Rotstein, S. Grinstein // J Gen Physiol. – 1993. – Vol. 102, N. 4. – P. 729-60.

- 76. Denker, S. P. Direct binding of the Na--H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation / S.P. Denker, D.C. Huang, J. Orlowski, H. Furthmayr, D.L. Barber // Mol Cell. – 2000. – Vol. 6, N. 6. – P. 1425-36.
- 77. Putney, L. K. Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G2/M entry and transition / L.K. Putney, D.L. Barber // J Biol Chem. 2003. Vol. 278, N. 45. P. 44645-9.
- 78. Harada, K. Metaphase I arrest of starfish oocytes induced via the MAP kinase pathway is released by an increase of intracellular pH / K. Harada, E. Oita, K. Chiba // Development. 2003. Vol. 130, N. 19. P. 4581-6.
- 79. Sellier, C. Intracellular acidification delays hormonal G2/M transition and inhibits G2/M transition triggered by thiophosphorylated MAPK in Xenopus oocytes / C. Sellier, J.F. Bodart, S. Flament, F. Baert, J. Gannon, J.P. Vilain // J Cell Biochem. – 2006. – Vol. 98, N. 2. – P. 287-300.
- Park, H. J. Cell cycle progression and apoptosis after irradiation in an acidic environment / H.J. Park, J.C. Lyons, T. Ohtsubo, C.W. Song // Cell Death Differ. - 2000. - Vol. 7, N. 8. - P. 729-38.
- 81. Zhao, R. DNA damage-induced Bcl-xL deamidation is mediated by NHE-1 antiport regulated intracellular pH / R. Zhao, D. Oxley, T.S. Smith, G.A. Follows, A.R. Green, D.R. Alexander // PLoS Biol. 2007. Vol. 5, N. 1. P. e1.
- Liao, C. Genomic screening in vivo reveals the role played by vacuolar H+ ATPase and cytosolic acidification in sensitivity to DNA-damaging agents such as cisplatin / C. Liao, B. Hu, M.J. Arno, B. Panaretou // Mol Pharmacol. – 2007. – Vol. 71, N. 2. – P. 416-25.
- 83. Harguindey, S. The role of pH dynamics and the Na+/H+ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin--one single nature / S. Harguindey, G. Orive, J. Luis Pedraz, A. Paradiso, S.J. Reshkin // Biochim Biophys Acta. 2005. Vol. 1756, N. 1. P. 1-24.
- Lagadic-Gossmann, D. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles / D. Lagadic-Gossmann, L. Huc, V. Lecureur // Cell Death Differ. – 2004. – Vol. 11, N. 9. – P. 953-61.
- Matsuyama, S. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis / S. Matsuyama, J. Llopis, Q.L. Deveraux, R.Y. Tsien, J.C. Reed // Nat Cell Biol. – 2000. – Vol. 2, N. 6. – P. 318-25.
- 86. Khaled, A. R. Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH / A.R. Khaled, K. Kim, R. Hofmeister, K. Muegge, S.K. Durum // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1999. – Vol. 96, N. 25. – P. 14476-81.
- 87. Gillet, J. P. Mechanisms of multidrug resistance in cancer / J.P. Gillet, M.M. Gottesman // Methods Mol Biol. 2010. Vol. 596. P. 47-76.
- Housman, G. Drug resistance in cancer: an overview / G. Housman, S. Byler, S. Heerboth, K. Lapinska, M. Longacre, N. Snyder, S. Sarkar // Cancers (Basel). 2014. Vol. 6, N. 3. P. 1769-92.

- Mahoney, B. P. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro / B.P. Mahoney, N. Raghunand, B. Baggett, R.J. Gillies // Biochem Pharmacol. 2003. Vol. 66, N. 7. P. 1207-18.
- 90. Daniel, The role of proton dynamics in the development and maintenance of multidrug resistance in cancer / C. Daniel, C. Bell, C. Burton, S. Harguindey, S.J. Reshkin, C. Rauch // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease. 2013. Vol. 1832, N. 5. P. 606-617.
- 91. Raghunand, N. pH and drug resistance in tumors / N. Raghunand, R.J. Gillies // Drug Resist Updat. 2000. Vol. 3, N. 1. P. 39-47.
- 92. Wojtkowiak, J. W. Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment / J.W. Wojtkowiak, D. Verduzco, K.J. Schramm, R.J. Gillies // Mol Pharm. 2011. Vol. 8, N. 6. P. 2032-8.
- 93. Alfarouk, K. O. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp / K.O. Alfarouk, C.M. Stock, S. Taylor, M. Walsh, A.K. Muddathir, D. Verduzco, A.H. Bashir, O.Y. Mohammed, G.O. Elhassan, S. Harguindey, S.J. Reshkin, M.E. Ibrahim, C. Rauch // Cancer Cell Int. – 2015. – Vol. 15. – P. 71.
- 94. MacIntyre, A. C. The potential role of lysosomes in tissue distribution of weak bases / A.C. MacIntyre, D.J. Cutler // Biopharm Drug Dispos. – 1988. – Vol. 9, N. 6. – P. 513-26.
- 95. Duvvuri, M. Intracellular drug sequestration events associated with the emergence of multidrug resistance: a mechanistic review / M. Duvvuri, J.P. Krise // Front Biosci. 2005. Vol. 10. P. 1499-509.
- 96. Jansen, G. Multiple mechanisms of resistance to polyglutamatable and lipophilic antifolates in mammalian cells: role of increased folylpolyglutamylation, expanded folate pools, and intralysosomal drug sequestration / G. Jansen, H. Barr, I. Kathmann, M.A. Bunni, D.G. Priest, P. Noordhuis, G.J. Peters, Y.G. Assaraf // Mol Pharmacol. – 1999. – Vol. 55, N. 4. – P. 761-9.
- 97. Adar, Y.
- Imidazoacridinone-dependent lysosomal photodestruction: a pharmacological Trojan horse approach to eradicate multidrug-resistant cancers / Y. Adar, M. Stark, E.E. Bram, P. Nowak-Sliwinska, H. van den Bergh, G. Szewczyk, T. Sarna, A. Skladanowski, A.W. Griffioen, Y.G. Assaraf // Cell Death Dis. – 2012. – Vol. 3, N. 4. – P. e293.
- 98. Gong, Y. Niemann-Pick C1 protein facilitates the efflux of the anticancer drug daunorubicin from cells according to a novel vesicle-mediated pathway / Y. Gong, M. Duvvuri, M.B. Duncan, J. Liu, J.P. Krise // J Pharmacol Exp Ther. 2006. Vol. 316, N. 1. P. 242-7.
- 99. Gotink, K. J. Lysosomal sequestration of sunitinib: a novel mechanism of drug resistance / K.J. Gotink, H.J. Broxterman, M. Labots, R.R. de Haas, H. Dekker, R.J. Honeywell, M.A. Rudek, L.V. Beerepoot, R.J. Musters, G. Jansen, A.W. Griffioen, Y.G. Assaraf, R. Pili, G.J. Peters, H.M. Verheul // Clin Cancer Res. – 2011. – Vol. 17, N. 23. – P. 7337-46.

- 100. Groth-Pedersen, L. Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine / L. Groth-Pedersen, M.S. Ostenfeld, M. Høyer-Hansen, J. Nylandsted, M. Jäättelä // Cancer Res. – 2007. – Vol. 67, N. 5. – P. 2217-25.
- 101. Herlevsen, M. Depletion of major vault protein increases doxorubicin sensitivity and nuclear accumulation and disrupts its sequestration in lysosomes / M. Herlevsen, G. Oxford, C.R. Owens, M. Conaway, D. Theodorescu // Mol Cancer Ther. – 2007. – Vol. 6, N. 6. – P. 1804-13.
- 102. Kazmi, F. Lysosomal sequestration (trapping) of lipophilic amine (cationic amphiphilic) drugs in immortalized human hepatocytes (Fa2N-4 cells) / F. Kazmi, T. Hensley, C. Pope, R.S. Funk, G.J. Loewen, D.B. Buckley, A. Parkinson // Drug Metab Dispos. 2013. Vol. 41, N. 4. P. 897-905.
- Zhitomirsky, B. Lysosomal sequestration of hydrophobic weak base chemotherapeutics triggers lysosomal biogenesis and lysosome-dependent cancer multidrug resistance / B. Zhitomirsky, Y.G. Assaraf // Oncotarget. – 2015. – Vol. 6, N. 2. – P. 1143-56.
- 104. Altan, N. Defective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy / N. Altan, Y. Chen, M. Schindler, S.M. Simon // J Exp Med. – 1998. – Vol. 187, N. 10. – P. 1583-98.
- 105. Larsen, A. K. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents / A.K. Larsen, A.E. Escargueil, A. Skladanowski // Pharmacol Ther. – 2000. – Vol. 85, N. 3. – P. 217-29.
- 106. Gong, Y. Separate roles for the Golgi apparatus and lysosomes in the sequestration of drugs in the multidrug-resistant human leukemic cell line HL-60 / Y. Gong, M. Duvvuri, J.P. Krise // J Biol Chem. – 2003. – Vol. 278, N. 50. – P. 50234-9.
- 107. Jähde, E. Hydrogen ion-mediated enhancement of cytotoxicity of bischloroethylating drugs in rat mammary carcinoma cells in vitro / E. Jähde, K.H. Glüsenkamp, I. Klünder, D.F. Hülser, L.F. Tietze, M.F. Rajewsky // Cancer Res. – 1989. – Vol. 49, N. 11. – P. 2965-72.
- 108. Skarsgard, L. D. The cytotoxicity of melphalan and its relationship to pH, hypoxia and drug uptake / L.D. Skarsgard, M.W. Skwarchuk, A. Vinczan, J. Kristl, D.J. Chaplin // Anticancer Res. – 1995. – Vol. 15, N. 1. – P. 219-23.
- 109. Connors, T. A. THE EFFECT OF GLUCOSE PRETREATMENT ON THE CARCINOSTATIC AND TOXIC ACTIVITIES OF SOME ALKYLATING AGENTS / T.A. Connors, B.C. Mitchley, V.M. Rosenoer, W.C. Ross // Biochem Pharmacol. – 1964. – Vol. 13. – P. 395-400.
- 110. Osinsky, S. Tumour pH under induced hyperglycemia and efficacy of chemotherapy / S. Osinsky, L. Bubnovskaja, T. Sergienko // Anticancer Res. – 1987. – Vol. 7, N. 2. – P. 199-201.
- 111. Kennedy, K. A. pH dependence of mitomycin C-induced cross-linking activity in EMT6 tumor cells / K.A. Kennedy, J.D. McGurl, L. Leondaridis, O. Alabaster // Cancer Res. – 1985. – Vol. 45, N. 8. – P. 3541-7.

- 112. Hahn, G. M. Effect of pH and elevated temperatures on the cytotoxicity of some chemotherapeutic agents on Chinese hamster cells in vitro / G.M. Hahn, E.C. Shiu // Cancer Res. – 1983. – Vol. 43, N. 12 Pt 1. – P. 5789-91.
- 113. Hahn, G. M. Adaptation to low pH modifies thermal and thermo-chemical responses of mammalian cells / G.M. Hahn, E.C. Shiu // Int J Hyperthermia. 1986. Vol. 2, N. 4. P. 379-87.
- 114. Urano, M. Effect of bleomycin on murine tumor cells at elevated temperatures and two different pH values / M. Urano, J. Kahn, L.A. Kenton // Cancer Res. 1988. Vol. 48, N. 3. P. 615-9.
- 115. Wike-Hooley, J. L. The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease / J.L. Wike-Hooley, J. Haveman, H.S. Reinhold // Radiother Oncol. 1984. Vol. 2, N. 4. P. 343-66.
- 116. Ferguson, P. J. Differential activity of vincristine and vinblastine against cultured cells / P.J. Ferguson, J.R. Phillips, M. Selner, C.E. Cass // Cancer Res. – 1984. – Vol. 44, N. 8. – P. 3307-12.
- 117. Hirpara, J. L. Intracellular acidification triggered by mitochondrial-derived hydrogen peroxide is an effector mechanism for drug-induced apoptosis in tumor cells / J.L. Hirpara, M.V. Clément, S. Pervaiz // J Biol Chem. – 2001. – Vol. 276, N. 1. – P. 514-21.
- 118. Ahmad, K. A. Hydrogen peroxide-mediated cytosolic acidification is a signal for mitochondrial translocation of Bax during drug-induced apoptosis of tumor cells / K.A. Ahmad, K.B. Iskandar, J.L. Hirpara, M.V. Clement, S. Pervaiz // Cancer Res. – 2004. – Vol. 64, N. 21. – P. 7867-78.
- 119. Willander, M. ZnO nanorods as an intracellular sensor for pH measurements / M. Willander, S. Al-Hilli // Methods Mol Biol. 2009. Vol. 544. P. 187-200.
- 120. Zhang, X. Tumor pH and its measurement / X. Zhang, Y. Lin, R.J. Gillies // J Nucl Med. – 2010. – Vol. 51, N. 8. – P. 1167-70.
- 121. Vāvere, A. L. A novel technology for the imaging of acidic prostate tumors by positron emission tomography / A.L. Vāvere, G.B. Biddlecombe, W.M. Spees, J.R. Garbow, D. Wijesinghe, O.A. Andreev, D.M. Engelman, Y.K. Reshetnyak, J.S. Lewis // Cancer Res. – 2009. – Vol. 69, N. 10. – P. 4510-6.
- 122. Zhang, S. A Novel pH-Sensitive MRI Contrast Agent / S. Zhang, K. Wu, A.D. Sherry // Angew Chem Int Ed Engl. 1999. Vol. 38, N. 21. P. 3192-3194.
- 123. Garcia-Martin, M. L. High resolution pH(e) imaging of rat glioma using pHdependent relaxivity / M.L. Garcia-Martin, G.V. Martinez, N. Raghunand, A.D. Sherry, S. Zhang, R.J. Gillies // Magn Reson Med. – 2006. – Vol. 55, N. 2. – P. 309-15.
- 124. Aime, S. Novel paramagnetic macromolecular complexes derived from the linkage of a macrocyclic Gd(III) complex to polyamino acids through a squaric acid moiety / S. Aime, M. Botta, S. Geninatti Crich, G. Giovenzana, G. Palmisano, M. Sisti // Bioconjug Chem. – 1999. – Vol. 10, N. 2. – P. 192-9.
- 125. Luker, G. D. Optical imaging: current applications and future directions / G.D. Luker, K.E. Luker // J Nucl Med. 2008. Vol. 49, N. 1. P. 1-4.

- 126. Boens, N. Photophysics of the fluorescent pH indicator BCECF / N. Boens, W. Qin, N. Basarić, A. Orte, E.M. Talavera, J.M. Alvarez-Pez // J Phys Chem A. 2006. Vol. 110, N. 30. P. 9334-43.
- 127. Gatto, C. Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues / C. Gatto, M.A. Milanick // Am J Physiol. – 1993. – Vol. 264, N. 6 Pt 1. – P. C1577-86.
- 128. Liu, J. Synthesis and photophysical properties of new fluorinated benzo[c]xanthene dyes as intracellular pH indicators / J. Liu, Z. Diwu, W.Y. Leung // Bioorg Med Chem Lett. 2001. Vol. 11, N. 22. P. 2903-5.
- 129. Balut, C. Measurement of cytosolic and mitochondrial pH in living cells during reversible metabolic inhibition / C. Balut, M. vandeVen, S. Despa, I. Lambrichts, M. Ameloot, P. Steels, I. Smets // Kidney Int. – 2008. – Vol. 73, N. 2. – P. 226-32.
- 130. Han, J. Fluorescent indicators for intracellular pH / J. Han, K. Burgess // Chem Rev. 2010. Vol. 110, N. 5. P. 2709-28.
- 131. Scharnagl, C. Molecular Basis for pH Sensitivity and Proton Transfer in Green Fluorescent Protein: Protonation and Conformational Substates from Electrostatic Calculations / C. Scharnagl, R. Raupp-Kossmann, S.F. Fischer // Biophysical Journal. – 1999. – Vol. 77, N. 4. – P. 1839-1857.
- 132. Matz, M. V. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species / M.V. Matz, A.F. Fradkov, Y.A. Labas, A.P. Savitsky, A.G. Zaraisky, M.L. Markelov, S.A. Lukyanov // Nat Biotechnol. – 1999. – Vol. 17, N. 10. – P. 969-73.
- 133. Miesenböck, G. Visualizing secretion and synaptic transmission with pHsensitive green fluorescent proteins / G. Miesenböck, D.A. De Angelis, J.E. Rothman // Nature. – 1998. – Vol. 394, N. 6689. – P. 192-5.
- 134. Li, S. Intracellular alkalinization induces cytosolic Ca2+ increases by inhibiting sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase (SERCA) / S. Li, B. Hao, Y. Lu, P. Yu, H.C. Lee, J. Yue // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, N. 2. – P. e31905.
- 135. Jung, G. Efficient photoconversion distorts the fluorescence lifetime of GFP in confocal microscopy: a model kinetic study on mutant Thr203Val / G. Jung, M. Werner, M. Schneider // Chemphyschem. – 2008. – Vol. 9, N. 13. – P. 1867-74.
- 136. Tantama, M. Imaging intracellular pH in live cells with a genetically encoded red fluorescent protein sensor / M. Tantama, Y.P. Hung, G. Yellen // J Am Chem Soc. - 2011. - Vol. 133, N. 26. - P. 10034-7.
- Poëa-Guyon, S. The enhanced cyan fluorescent protein: a sensitive pH sensor for fluorescence lifetime imaging / S. Poëa-Guyon, H. Pasquier, F. Mérola, N. Morel, M. Erard // Anal Bioanal Chem. – 2013. – Vol. 405, N. 12. – P. 3983-7.
- Poburko, D. Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations / D. Poburko, J. Santo-Domingo, N. Demaurex // J Biol Chem. – 2011. – Vol. 286, N. 13. – P. 11672-84.
- 139. Belousov, V. V. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide / V.V. Belousov, A.F. Fradkov, K.A. Lukyanov, D.B.

Staroverov, K.S. Shakhbazov, A.V. Terskikh, S. Lukyanov // Nat Methods. – 2006. – Vol. 3, N. 4. – P. 281-6.

- 140. Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: Applications in neuroscience and regenerative biology / M.E. Matlashov, Y.A. Bogdanova, G.V. Ermakova, N.M. Mishina, Y.G. Ermakova, E.S. Nikitin, P.M. Balaban, S. Okabe, S. Lukyanov, G. Enikolopov, A.G. Zaraisky, V.V. Belousov // Biochim Biophys Acta. – 2015. – Vol. 1850, N. 11. – P. 2318-28.
- 141. Evans, C. L. Killing hypoxic cell populations in a 3D tumor model with EtNBS-PDT / C.L. Evans, A.O. Abu-Yousif, Y.J. Park, O.J. Klein, J.P. Celli, I. Rizvi, X. Zheng, T. Hasan // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, N. 8. – P. e23434.
- 142. Markvicheva, K. N. A genetically encoded sensor for H2O2 with expanded dynamic range / K.N. Markvicheva, D.S. Bilan, N.M. Mishina, A.Y. Gorokhovatsky, L.M. Vinokurov, S. Lukyanov, V.V. Belousov // Bioorg Med Chem. – 2011. – Vol. 19, N. 3. – P. 1079-84.
- 143. Llopis, J. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins / J. Llopis, J.M. McCaffery, A. Miyawaki, M.G. Farquhar, R.Y. Tsien // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1998. – Vol. 95, N. 12. – P. 6803-8.
- 144. Cianchi, F. Selective inhibition of carbonic anhydrase IX decreases cell proliferation and induces ceramide-mediated apoptosis in human cancer cells / F. Cianchi, M.C. Vinci, C.T. Supuran, B. Peruzzi, P. De Giuli, G. Fasolis, G. Perigli, S. Pastorekova, L. Papucci, A. Pini, E. Masini, L. Puccetti // J Pharmacol Exp Ther. – 2010. – Vol. 334, N. 3. – P. 710-9.
- 145. He, XiaoXiao Research of the relationship of intracellular acidification and apoptosis in Hela cells based on pH nanosensors / X. He, Y. Wang, K. Wang, J. Peng, F. Liu, W. Tan // Science in China Series B: Chemistry. – 2007. – Vol. 50, N. 2. – P. 258-265.
- 146. Hirschhaeuser, F. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again / F. Hirschhaeuser, H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser, L.A. Kunz-Schughart // J Biotechnol. – 2010. – Vol. 148, N. 1. – P. 3-15.
- 147. Chignola, R. Computational challenges of tumor spheroid modeling / R. Chignola, A.D. Fabbro, M. Farina, E. Milotti // J Bioinform Comput Biol. 2011. Vol. 9, N. 4. P. 559-77.
- 148. Hulikova, A. Dual role of CO2/HCO3(-) buffer in the regulation of intracellular pH of three-dimensional tumor growths / A. Hulikova, R.D. Vaughan-Jones, P. Swietach // J Biol Chem. – 2011. – Vol. 286, N. 16. – P. 13815-26.
- 149. Sirenko, O. High-content assays for characterizing the viability and morphology of 3D cancer spheroid cultures / O. Sirenko, T. Mitlo, J. Hesley, S. Luke, W. Owens, E.F. Cromwell // Assay Drug Dev Technol. – 2015. – Vol. 13, N. 7. – P. 402-14.
- 150. Acker, H.
- Influence of glucose and buffer capacity in the culture medium on growth and pH in spheroids of human thyroid carcinoma and human glioma origin / H. Acker, J.

Carlsson, G. Holtermann, T. Nederman, T. Nylén // Cancer Res. – 1987. – Vol. 47, N. 13. – P. 3504-8.

- 151. Carlsson, J. Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids / J. Carlsson, H. Acker // Int J Cancer. – 1988. – Vol. 42, N. 5. – P. 715-20.
- 152. Swietach, P. Tumor-associated carbonic anhydrase 9 spatially coordinates intracellular pH in three-dimensional multicellular growths / P. Swietach, S. Wigfield, P. Cobden, C.T. Supuran, A.L. Harris, R.D. Vaughan-Jones // J Biol Chem. – 2008. – Vol. 283, N. 29. – P. 20473-83.
- 153. Weinlich, M. Human duodenal spheroids for noninvasive intracellular pH measurement and quantification of regulation mechanisms under physiological conditions / M. Weinlich, C. Baumstark, E. Usta, H.D. Becker, M.J. Sessler // In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2002. Vol. 38, N. 1. P. 7-13.
- Jamieson, L. E. Chemical analysis of multicellular tumour spheroids / L.E. Jamieson, D.J. Harrison, C.J. Campbell // Analyst. 2015. Vol. 140, N. 12. P. 3910-20.
- 155. Langan, L. M. Direct Measurements of Oxygen Gradients in Spheroid Culture System Using Electron Parametric Resonance Oximetry / L.M. Langan, N.J. Dodd, S.F. Owen, W.M. Purcell, S.K. Jackson, A.N. Jha // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, N. 2. – P. e0149492.
- 156. Zanoni, M. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained / M. Zanoni, F. Piccinini, C. Arienti, A. Zamagni, S. Santi, R. Polico, A. Bevilacqua, A. Tesei // Sci Rep. 2016. Vol. 6. P. 19103.
- 157. Chitcholtan, K. The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer / K. Chitcholtan, P.H. Sykes, J.J. Evans // J Transl Med. – 2012. – Vol. 10. – P. 38.
- 158. The metabolic interaction of cancer cells and fibroblasts coupling between NAD(P)H and FAD, intracellular pH and hydrogen peroxide / I.N. Druzhkova, M.V. Shirmanova, M.M. Lukina, V.V. Dudenkova, N.M. Mishina, E.V. Zagaynova // Cell Cycle. – 2016. – Vol. 15, N. 9. – P. 1257-66.
- 159. Rossignol, R. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells / R. Rossignol, R. Gilkerson, R. Aggeler, K. Yamagata, S.J. Remington, R.A. Capaldi // Cancer Res. 2004. Vol. 64, N. 3. P. 985-93.
- 160. Marín-Hernández, A. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly productinhibited hexokinase / A. Marín-Hernández, S. Rodríguez-Enríquez, P.A. Vital-González, F.L. Flores-Rodríguez, M. Macías-Silva, M. Sosa-Garrocho, R. Moreno-Sánchez // Febs j. – 2006. – Vol. 273, N. 9. – P. 1975-88.
- 161. Rodríguez-Enríquez, S. Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids / S. Rodríguez-Enríquez, J.C. Gallardo-Pérez, A. Avilés-Salas, A. Marín-Hernández, L. Carreño-Fuentes, V. Maldonado-Lagunas, R. Moreno-Sánchez // J Cell Physiol. – 2008. – Vol. 216, N. 1. – P. 189-97.

- 162. Pinheiro, C. Lactate transporters and vascular factors in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix / C. Pinheiro, E.A. Garcia, F. Morais-Santos, C. Scapulatempo-Neto, A. Mafra, R.D. Steenbergen, E. Boccardo, L.L. Villa, F. Baltazar, A. Longatto-Filho // BMC Cancer. 2014. Vol. 14. P. 751.
- 163. Yang, Xi Role of Exosomes in Crosstalk Between Cancer-Associated Fibroblasts and Cancer Cells / X. Yang, Y. Li, L. Zou, Z. Zhu // Frontiers in oncology. – 2019. – Vol. 9. – P. 356-356.
- 164. Meacham, C. E. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity / C.E. Meacham, S.J. Morrison // Nature. – 2013. – Vol. 501, N. 7467. – P. 328-37.
- 165. Mordon, S. In vivo pH measurement and imaging of tumor tissue using a pHsensitive fluorescent probe (5,6-carboxyfluorescein): instrumental and experimental studies / S. Mordon, J.M. Devoisselle, V. Maunoury // Photochem Photobiol. – 1994. – Vol. 60, N. 3. – P. 274-9.
- 166. Liu, G. Imaging in vivo extracellular pH with a single paramagnetic chemical exchange saturation transfer magnetic resonance imaging contrast agent / G. Liu, Y. Li, V.R. Sheth, M.D. Pagel // Mol Imaging. – 2012. – Vol. 11, N. 1. – P. 47-57.
- 167. Chiche, J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer / J. Chiche, M.C. Brahimi-Horn, J. Pouysségur // J Cell Mol Med. – 2010. – Vol. 14, N. 4. – P. 771-94.
- 168. Vaupel, P. W. Heterogeneous oxygen partial pressure and pH distribution in C3H mouse mammary adenocarcinoma / P.W. Vaupel, S. Frinak, H.I. Bicher // Cancer Res. 1981. Vol. 41, N. 5. P. 2008-13.
- 169. Kallinowski, F. pH distributions in spontaneous and isotransplanted rat tumours / F. Kallinowski, P. Vaupel // Br J Cancer. – 1988. – Vol. 58, N. 3. – P. 314-21.
- 170. Jin, Y. J. Dystrophic calcification in the epidural and extraforaminal space caused by repetitive triamcinolone acetonide injections / Y.J. Jin, S.B. Chung, K.J. Kim, H.J. Kim // J Korean Neurosurg Soc. – 2011. – Vol. 50, N. 2. – P. 134-8.
- 171. Kim, K. M. Apoptosis and calcification / K.M. Kim // Scanning Microsc. 1995. – Vol. 9, N. 4. – P. 1137-75; discussion 1175-8.
- 172. Dhar, D. Idiopathic soft tissue calcification in an extremity: a case report / D. Dhar, T.P. Varghese // Oman Med J. 2013. Vol. 28, N. 2. P. 131-2.
- 173. Недзьведь М.К., Патологическая анатомия / Ч.Е.Д. Недзьведь М.К. Минск: Вышэйшая школа, 2011of.
- 174. Shrode, L. D. Role of intracellular pH in proliferation, transformation, and apoptosis / L.D. Shrode, H. Tapper, S. Grinstein // J Bioenerg Biomembr. – 1997. – Vol. 29, N. 4. – P. 393-9.
- 175. Park, H. J. Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity / H.J. Park, J.C. Lyons, T. Ohtsubo, C.W. Song // Br J Cancer. – 1999. – Vol. 80, N. 12. – P. 1892-7.
- 176. Counis, M. F. Acid DNases and their interest among apoptotic endonucleases / M.F. Counis, A. Torriglia // Biochimie. – 2006. – Vol. 88, N. 12. – P. 1851-8.
- 177. Rebillard, A. Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells / A. Rebillard, X. Tekpli, O.

Meurette, O. Sergent, G. LeMoigne-Muller, L. Vernhet, M. Gorria, M. Chevanne, M. Christmann, B. Kaina, L. Counillon, E. Gulbins, D. Lagadic-Gossmann, M.T. Dimanche-Boitrel // Cancer Res. – 2007. – Vol. 67, N. 16. – P. 7865-74.

- 178. Milosavljevic, N. Nongenomic effects of cisplatin: acute inhibition of mechanosensitive transporters and channels without actin remodeling / N. Milosavljevic, C. Duranton, N. Djerbi, P.H. Puech, P. Gounon, D. Lagadic-Gossmann, M.T. Dimanche-Boitrel, C. Rauch, M. Tauc, L. Counillon, M. Poët // Cancer Res. – 2010. – Vol. 70, N. 19. – P. 7514-22.
- 179. Pan, Z. Paclitaxel induces apoptosis in breast cancer cells through different calcium--regulating mechanisms depending on external calcium conditions / Z. Pan, A. Avila, L. Gollahon // Int J Mol Sci. 2014. Vol. 15, N. 2. P. 2672-94.
- 180. Danthuluri, N. R. Intracellular alkalinization leads to Ca2+ mobilization from agonist-sensitive pools in bovine aortic endothelial cells / N.R. Danthuluri, D. Kim, T.A. Brock // J Biol Chem. – 1990. – Vol. 265, N. 31. – P. 19071-6.
- 181. Humez, S. The role of intracellular pH in cell growth arrest induced by ATP / S. Humez, M. Monet, F. van Coppenolle, P. Delcourt, N. Prevarskaya // Am J Physiol Cell Physiol. – 2004. – Vol. 287, N. 6. – P. C1733-46.
- 182. Huizing, M. T. Taxanes: a new class of antitumor agents / M.T. Huizing, V.H. Misser, R.C. Pieters, W.W. ten Bokkel Huinink, C.H. Veenhof, J.B. Vermorken, H.M. Pinedo, J.H. Beijnen // Cancer Invest. 1995. Vol. 13, N. 4. P. 381-404.
- 183. Svoboda, M. Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function / M. Svoboda, J. Riha, K. Wlcek, W. Jaeger, T. Thalhammer // Curr Drug Metab. – 2011. – Vol. 12, N. 2. – P. 139-53.
- 184. Martinez-Becerra, P. Further characterization of the electrogenicity and pH sensitivity of the human organic anion-transporting polypeptides OATP1B1 and OATP1B3 / P. Martinez-Becerra, O. Briz, M.R. Romero, R.I. Macias, M.J. Perez, C. Sancho-Mateo, M.P. Lostao, J.M. Fernandez-Abalos, J.J. Marin // Mol Pharmacol. 2011. Vol. 79, N. 3. P. 596-607.
- 185. Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters / S. Leuthold, B. Hagenbuch, N. Mohebbi, C.A. Wagner, P.J. Meier, B. Stieger // Am J Physiol Cell Physiol. – 2009. – Vol. 296, N. 3. – P. C570-82.
- 186. Ehrlichova, M. Transport and cytotoxicity of paclitaxel, docetaxel, and novel taxanes in human breast cancer cells / M. Ehrlichova, R. Vaclavikova, I. Ojima, A. Pepe, L.V. Kuznetsova, J. Chen, J. Truksa, J. Kovar, I. Gut // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2005. Vol. 372, N. 1. P. 95-105.
- 187. Reshkin, S. J. Paclitaxel induces apoptosis via protein kinase A- and p38 mitogen-activated protein-dependent inhibition of the Na+/H+ exchanger (NHE) NHE isoform 1 in human breast cancer cells / S.J. Reshkin, A. Bellizzi, R.A. Cardone, M. Tommasino, V. Casavola, A. Paradiso // Clin Cancer Res. 2003. Vol. 9, N. 6. P. 2366-73.
- 188. Hou, L. Interfering cellular lactate homeostasis overcomes Taxol resistance of breast cancer cells through the microRNA-124-mediated lactate transporter
(MCT1) inhibition / L. Hou, Y. Zhao, G.Q. Song, Y.H. Ma, X.H. Jin, S.L. Jin, Y.H. Fang, Y.C. Chen // Cancer Cell Int. – 2019. – Vol. 19. – P. 193.

- 189. Halestrap, A. P. The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization / A.P. Halestrap // IUBMB Life. – 2012. – Vol. 64, N. 1. – P. 1-9.
- Aoudjit, F. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells / F. Aoudjit, K. Vuori // Oncogene. – 2001. – Vol. 20, N. 36. – P. 4995-5004.
- 191. Tominaga, T. Na-H exchange acts downstream of RhoA to regulate integrininduced cell adhesion and spreading / T. Tominaga, D.L. Barber // Mol Biol Cell. - 1998. - Vol. 9, N. 8. - P. 2287-303.
- 192. Ringel, I. Effect of alkaline pH on taxol-microtubule interactions / I. Ringel, S.B. Horwitz // J Pharmacol Exp Ther. 1991. Vol. 259, N. 2. P. 855-60.