

**Разработка клеточной линии с магнитной и флуоресцентной метками для моделирования и долгосрочного отслеживания клеток экспериментальной глиомы крысы С6**

**Научный руководитель – Габашвили Анна Николаевна**

**Милованова Марина Владимировна**

*Студент (магистр)*

Институт общей физики им. А.М.Прохорова РАН, Москва, Россия

*E-mail: milovanova.vmar@gmail.com*

Мультиформная глиобластома человека (МГЧ) является инкурабельной опухолью головного мозга с медианой выживаемости пациентов около 15 месяцев после постановки диагноза. Для разработки новых методов терапии и диагностики МГЧ важно иметь подходящие животные модели для проведения исследований *in vivo*. Золотым стандартом моделей является экспериментальная глиома крысы С6, близкая МГЧ по паттерну экспрессируемых маркеров, характеру и темпам роста [1]. Разработка новых методов отслеживания клеток С6 *in vivo* является крайне актуальной задачей для изучения процессов роста, миграции, инвазии клеток опухоли и исследования ответа глиомы на терапию.

Мы представляем линию клеток глиомы С6, содержащую генетически кодируемую метку на основе инкапсулина бактерии *Quasibacillus thermotolerans* (Qt), представляющую собой белковую оболочку диаметром 42 нм, с ферментом ферроксидазой внутри, способную накапливать около 30 000 атомов железа. При добавлении к клеткам FAS (ferrous ammonium sulfate) фермент окисляет  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$  с образованием магнитных наночастиц (МНЧ) диаметром около 25 нм. [2]. Для возможности мультимодальной визуализации, в клетки были также встроены гены, кодирующие RFP.

Генетическая последовательность была встроена с помощью лентивирусной трансдукции. Экспрессия генов Qt была подтверждена при помощи ПЦР, а наличие белков-номеров оболочки — с помощью Вестерн-блот анализа. Было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание клеток антителами против последовательности на протомерах оболочек. Качественная и количественная оценка накопления железа в полученных клетках проводилась методами окраски Прусским синим и ICP MS, соответственно. Анализу предшествовала оценка токсичности FAS с помощью резазуринового теста. Величина магнитного сигнала в клетках С6-RFP-Qt и контрольных клетках, а также время T2 релаксации и оценка МР-контраста проводились методами магнитометрии и МРТ, соответственно. Оценка транспорта  $Fe^{2+}$  в клетки проводилась с помощью конфокальной микроскопии после окраски сенсором HM-Rho-NoxM. Резазуриновый тест продемонстрировал, что FAS безопасен для клеток С6-RFP-Qt в концентрациях 1 мМ и менее. Окрашивание Прусским синим показало светло-голубое окрашивание депозитов железа в цитоплазме клеток, количественно соответствующее 6,8 пг железа на клетку (против 0,2 пг железа на клетку в контроле). Также, магнитный сигнал и МР контраст в клетках С6-RFP-Qt существенно выражены, а время релаксации T2 снижено по сравнению с контрольными клетками.

Таким образом была получена уникальная клеточная линия с генетически кодируемыми метками, которая может использоваться как при изучении процессов миграции и инвазии глиомы, так и для исследования ответа опухоли на терапию.

**Источники и литература**

- 1) Aliferis C., Trafalis D. T. doi:10.1016/2015.05.005
- 2) Gabashvili A. N. doi:10.3390/10060966