

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ
ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЕННОЙ СТРУИ АТМОСФЕРНОГО ДАВЛЕНИЯ

Патракова Екатерина Андреевна

1.5.4 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

д.б.н. Коваль Ольга Александровна

Новосибирск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ВОЗДЕЙСТВИЕ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЫ И ПРОЦЕССЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	13
1.1. Действующие частицы	15
1.2. Транспорт активных частиц.....	19
1.2.1. Растворение и перенос веществ в жидкой фазе	20
1.2.2. Десольватация активных частиц плазмы при взаимодействии с жидкой фазой 21	
1.2.3. Реакции на границе раздела	22
1.3. Воздействие на биомолекулы.....	23
1.3.1. Аминокислоты, пептиды и белки	23
1.3.2. Углеводы клетки как мишени холодной плазмы	27
1.3.3. Липиды	27
1.3.4. Нуклеиновые кислоты	29
1.4. Внутриклеточный ответ на воздействие ХПС	31
1.4.1. Активные вещества холодной плазмы взаимодействуют с ферментами клеточных мембран	31
1.4.2. Холодная плазма влияет на целостность и проницаемость мембран и их способности к эндоцитозу	32
1.4.3. Изменение потока ионов и рН влияют на митохондрии и эндоплазматический ретикулум.....	33
1.4.4. Облучение холодной плазмой влияет на содержание ядерной ДНК и репликативную/транскрипционную активность	34
1.4.5. Холодная плазма влияет на содержание метаболитов в цитоплазме.....	35
1.5. Влияние холодной плазмы на основные клеточные процессы	36
1.5.1. Пролиферация.....	36

1.5.2.	Миграция.....	37
1.5.3.	ХПС-индуцированная аутофагия	38
1.5.4.	Гибель клеток вследствие активации старения.....	38
1.5.5.	ХПС-индуцируемый апоптоз.....	39
1.5.6.	Иммунный ответ.....	40
1.6.	Заключение	41
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....		42
2.1.	Материалы и оборудование	42
2.1.1	Реактивы и материалы	42
2.1.2	Оборудование	42
2.1.3	Буферы и растворы	43
2.1.4	Олигонуклеотиды.....	43
2.1.5	Клеточные культуры.....	44
2.1.6	Лабораторные животные	44
2.2	Методы.....	44
2.2.1	Культивирование эукариотических культур клеток.....	44
2.2.2	Обработка холодной плазменной струей.....	45
2.2.3	Анализ цитотоксического действия ХПС (МТТ-тест)	46
2.2.4	Определение жизнеспособности клеток в режиме реального времени на приборе iCELLigence.....	46
2.2.5	Визуализация жизнеспособности клеток методом флуоресцентной микроскопии	46
2.2.6	Анализ изменения концентраций внутриклеточных активных форм кислорода при непрямой обработке ХПС.....	47
2.2.7	Количественное определение концентрации пероксида водорода в культуральной среде флуориметрическим методом.....	47
2.2.8	Количественное определение концентрации нитритов в культуральной среде методом Грисса	47
2.2.9	Выделение суммарной клеточной РНК	48

2.2.10	Электрофорез в агарозном геле	48
2.2.11	ОТ-ПЦР в режиме реального времени.....	48
2.2.12	Анализ жизнеспособности клеток в системе аннексин V-йодид пропидия 49	
2.2.13	Анализ фагоцитарной активности клеток	49
2.2.14	Анализ жизнеспособности клеток сфероидов методом проточной цитометрии 49	
2.2.15	Трансплантация опухолевых клеток мышам и облучение ХПС	50
2.2.16	Статистический анализ данных	50
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....		51
3.1.	Параметры, влияющие на цитотоксический эффект холодной плазменной струи 51	
3.1.1	Продолжительность облучения	52
3.1.2	Способ облучения	53
3.1.3	Рабочий раз	54
3.1.4	Скорость газа	56
3.1.5	Напряжение.....	57
3.1.6	Использование заземленной подложки	59
3.1.7	Частота	62
3.1.8	Расстояние от сопла до облучаемого объекта	64
3.1.9	Тип клеток.....	65
3.1.10	Количество клеток	66
3.2	Сравнение чувствительности нормальных и онкотрансформированных клеток человека к обработке ХПС	67
3.2.1	Продолжительность облучения	68
3.2.2	Введение в систему заземленной подложки.....	69
3.2.3	Выбор скорости газа	70
3.3	Определение активных форм кислорода и азота.....	71

3.3.1	Анализ изменения внеклеточных активных форма кислорода и азота, индуцированных культуральной средой, облученной холодной плазменной струей.....	72
3.3.1.1	Анализ изменения внеклеточных активных форм кислорода при культивировании клеток в среде, облученной ХПС	72
3.3.1.2	Анализ изменения внеклеточных активных форма азота, при культивировании клеток в среде, активированной ХПС.....	73
3.3.2	Анализ изменения внутриклеточных активных форма кислорода, индуцированных культуральной средой, облученной холодной плазменной струей.....	75
3.4	Анализ активации аквапориновых каналов под действием холодной плазменной струи.	77
3.5	Исследование индукции клеточной гибели в клетках, облученных ХПС ...	79
3.6	Исследование цитотоксической активности холодной плазменной струи в отношении 3D клеточной модели рака молочной железы человека.....	80
3.6.1	Изменение морфологии сфероидов и жизнеспособности клеток в составе сфероидов при прямом облучении ХПС и в присутствии СО-ХПС.	81
3.6.2	Изменение активных форм кислорода в клетках сфероидов, подвергнутых прямому или опосредованному воздействию ХПС.	83
3.6.3	Захват фагоцитирующими клетками клеток сфероидов, облученных ХПС.	85
3.7	Исследование противоопухолевых эффектов холодной плазменной струи in vivo	86
3.7.1	Исследование термических побочных эффектов при облучении ХПС....	86
3.7.2	Облучение опухолей, образованных клетками глиобластомы человека U87MG	87
1.1.1.	Анализ гистологических изменений у животных в месте воздействия холодной плазменной струи.	88
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	90
	ВЫВОДЫ	91
	СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	92
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:	93

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AQP - аквапорин

DAMPs – паттерны молекул, ассоциированные с сигналами опасности

H₂DCFDA – диацетат 2',7'-дихлорофлуоресцеина

FBS – сыворотка крови крупного рогатого скота

FITC – флуоресцеин изотиоционат

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа

HMGB1 – белок группы высокой подвижности 1

HSP – белок теплового шока

ICD – иммуногенная клеточная гибель

IFN – интерферон

MFI - средняя интенсивность флуоресценции

MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид

PBS – натрий-фосфатный буфер

PI – йодид пропидия

SD – стандартное отклонение

АТФ – аденозинтрифосфат

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

ДБР – диэлектрический барьерный разряд

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

п.н. – пара нуклеотидов

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТРО - торможение роста опухоли

Трис – 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол

УФ - ультрафиолет

ХПС – холодная плазменная струя

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Для борьбы со злокачественными новообразованиями, наряду с внедрением новых противоопухолевых химиопрепаратов, проводится модификация существующих и разработка новых физических методов воздействия на опухоли: радиотерапии, фотонотерапии, протонотерапии и борнейтронзахватной терапии. Одним из многообещающих биофизических подходов к терапии целого ряда злокачественных новообразований является воздействие на опухоли струей холодной плазмы.

Холодная плазма - ионизированный газ, состоящий из заряженных частиц, активных незаряженных частиц, электрического поля и УФ-излучения. Ионизированный газ взаимодействует с частицами окружающей среды: молекулами и атомами воздуха и воды. Образующийся поток плазмы состоит из радикалов, молекул, заряженных молекул, среди которых главную роль играют активные формы кислорода и азота (АФКА), а также электронов и фотонов. Таким образом, плазма, взаимодействуя с мишенями, оказывает на них физическое (ультрафиолетовое излучение, электромагнитное поле) и химическое (образование АФКА) воздействие. АФКА активно взаимодействуют с биомишенями - тканями, жидкостями и клетками, стимулируя образование вторичных активных молекул. Привлекательной особенностью холодной плазменной струи (ХПС) для применения в онкологии является её низкая температура в области непосредственного контакта плазмы с биологическим объектом. На сегодняшний день плазменную струю успешно применяют в экспериментальных моделях *in vitro* и на животных-опухоленосителях.

Среди генерируемых плазмой АФКА наибольший интерес вызывает роль активных форм азота, а именно образование и действие оксида азота (NO) и его производных на жизнеспособность онкотрансформированных клеток. Известно, что низкая концентрация NO в опухолевых клетках индуцирует рост и пролиферацию клеток, тогда как высокие уровни, наоборот, способствует гибели по пути апоптоза. При попадании в жидкую среду оксид азота может превращаться в ионы нитритов (NO_2^-) и нитратов (NO_3^-), которые влияют на клетки, вызывая длительный стресс, приводящий к остановке клеточного цикла и к гибели.

Несмотря на расширяющийся круг работ, достижение селективности по отношению к опухолевым клеткам и установление механизма действия ХПС до сих пор остаются предметом исследований в области плазменной медицины.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось исследование цитотоксического и противоопухолевого эффекта холодной плазменной струи и оптимизация параметров воздействия для достижения селективности и повышения эффективности.

Для достижения донной цели были поставлены следующие задачи:

1. Установление параметров ХПС, влияющих на цитотоксический эффект холодной плазменной струи.
2. Сравнение чувствительности нормальных и онкотрансформированных клеток человека к обработке ХПС.
3. Определение содержания внеклеточных и внутриклеточных активных форм кислорода и азота после облучения ХПС.
4. Анализ изменения транскрипционной активности генов аквапоринов в результате воздействия холодной плазменной струи.
5. Исследование цитотоксической активности холодной плазменной струи в отношении 3D клеточной модели рака молочной железы человека.
6. Исследование эффектов холодной плазменной струи *in vivo*.

Научная новизна полученных результатов и практическая значимость

В результате научного исследования было показано, что на цитотоксический эффект холодной плазменной струи (ХПС) влияют продолжительность облучения, скорость газа, наличие заземленной подложки, частота, а также тип клеток и их количество. Были определены условия ХПС, вызывающие преимущественную гибель опухолевых клеток карциномы кожи человека A431, аденокарциномы кожи человека A549 и аденокарциномы молочной железы MCF7 без цитотоксических эффектов на здоровых клетках почки эмбриона человека HEK 293, фибробластов легкого Wi-38 и нетрансформированной молочной железы человека MCF10A, соответственно. Было установлено, что использование заземленной подложки, подбор времени облучения и оптимальной скорости газа позволяет усилить цитотоксический эффект ХПС в отношении опухолевых клеток.

Активные формы азота и кислорода считаются основными действующими веществами, ответственными за цитотоксический эффект ХПС, поэтому на следующем этапе исследования были проанализированы изменения внеклеточных и внутриклеточных активных форм кислорода и азота, а также их транспорт в клетку через аквапориновые каналы. Показано, что облучение ХПС культуральной среды (опосредованное воздействие) индуцирует образование в ней нитритов, и генерация нитритов зависит от

продолжительности облучения. Добавление облученной ХПС среды к клеткам не ведет к увеличению концентрации внеклеточной H_2O_2 . При этом не обнаружено достоверных различий в концентрации пероксида водорода и нитритов в облученной среде при культивировании опухолевых и нормальных клеток человека. Методом проточной цитометрии показано, что непрямое облучение клеток ХПС вызывало увеличение концентраций внутриклеточных активных форм кислорода и азота в опухолевых клетках А431, чего не наблюдалось для здоровых клеток НЕК 293. Увеличение времени облучения вело к увеличению концентрации этих форм. Анализ активации аквапориновых каналов методом ОТ-ПЦР в реальном времени выявил, что культивирование клеток в присутствии среды, облученной ХПС, ведет к активации экспрессии генов аквапоринов AQP-1 и AQP-8. Изначально более высокий уровень аквапоринов в раковых клетках А431 может способствовать лучшему транспорту активных форм кислорода и азота в раковые клетки и тем самым быть ответственным за селективность действия ХПС.

При исследовании механизма клеточной гибели было показано, что ХПС-облученная среда вызывает преимущественно гибель опухолевых клеток по типу апоптоза.

Впервые исследовано влияние ХПС на сфероиды рака молочной железы MCF7-EGFR, в геном которых встроен ген рецептор эпидермального фактора роста EGFR. Облучение сфероидов MCF7-EGFR вело к деструкции многоклеточных 3D структур на отдельные клетки с активацией в них процессов гибели. Показано, что клетки облученных сфероидов подвергаются фагоцитозу активированными макрофагами. При сравнении прямого воздействия ХПС и культивирования сфероидов MCF7-EGFR в среде, облученной ХПС, обнаружено большее содержание активных форм кислорода и азота в клетках сфероидов при культивировании в облученной среде, что далее ведет к большему цитотоксическому эффекту, чем при прямом облучении.

Прямое облучение ХПС подкожных опухолей глиобластомы человека U87MG приводит к торможению роста опухоли. Впервые показано, что использование заземленной подложки и увлажнение усиливают противоопухолевый эффект.

Таким образом, было показано, что ХПС обладает цитотоксической и противоопухолевой активностью. Полученные данные об проникновении активных форм кислорода и азота будут полезны для понимания закономерностей механизма их противоопухолевого действия. Подбор подходящих параметров облучения среди тех, которые оказывают влияние на цитотоксический эффект, позволит впоследствии внедрить ХПС в клиническую практику.

Положения, выносимые на защиту

1. Продолжительность облучения культивируемых клеток, скорость газа, наличие заземленной подложки, частота, а также тип клеток и их количество влияют на цитотоксический эффект холодной плазменной струи (ХПС).
2. Оптимизация условий облучения - использование заземленной подложки, подбор времени облучения и оптимальной скорости газа позволяет усилить цитотоксический эффект ХПС в отношении опухолевых клеток.
3. Облучение ХПС культуральной среды индуцирует повышает в ней концентрацию нитритов, и такая генерация нитритов зависит от продолжительности облучения.
4. Культивирование клеток в присутствии облученной ХПС культуральной среды приводит к увеличению в клетках концентраций активных форм кислорода и азота.
5. Культивирование клеток в присутствии среды, облученной ХПС влияет на экспрессию мРНК мембранных белков-транспортеров семейства аквапоринов.
6. ХПС-облученная среда вызывает преимущественно гибель клеток по типу апоптоза.
7. Сфероиды MCF7-EGFR чувствительны как к прямому облучению ХПС, так и к воздействию культуральной среды, облученной ХПС, и эти воздействия сопровождаются изменением содержания активных форм кислорода внутри клеток и дезинтеграцией клеток сфероидов, которые подвергаются захвату макрофагами
8. Экспериментально подобраны условия облучения ХПС подкожных опухолей глиобластомы человека U87MG, приводящие к торможению роста опухоли. Использование заземленной подложки и увлажнение усиливают противоопухолевый эффект.

Публикации и апробации результатов

По результатам работы опубликовано 6 работ в рецензируемых журналах. Результаты работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: всероссийской мультikonференции с международным участием «Биотехнология-медицине будущего» (Новосибирск, 2019), 27й конференции ECDO «Cell death and Regeneration» (Дрезден, Германия, 2019), международной конференции "MOLECULAR MECHANISMS OF AUTOPHAGY IN DISEASES" (Санкт-Петербург, 2020), международном 45м конгрессе FEBS «Molecules of life: Toward new horizons» (онлайн-конференция, 2021), международной научной студенческой конференции «МНСК-2022» (Новосибирск. 2022).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, списка цитированной литературы. Работа изложена на 105 страницах, включает 42 рисунка и 2 таблицы. Список литературы содержит 157 литературных источников.

Личный вклад автора

Основная часть работы была выполнена автором лично, либо с ее непосредственным участием. Эксперименты на мышах были проведены совместно со студентами и аспирантами лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН. Эксперименты по исследованию свойств холодной плазмы были проведены в Институте физики полупроводников совместно с д.ф.-м.н. Закревским Дмитрием Эдуардовичем (ИФП СО РАН) и д.ф.-м.н. Швейгерт Ириной Вячеславовной (ИТПМ СО РАН).

ГЛАВА 1. ВОЗДЕЙСТВИЕ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЫ И ПРОЦЕССЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Плазма — это ионизированный газ, состоящий из заряженных частиц (электронов и ионов), нейтральных частиц (атомов и молекул) и фотонов. Взаимодействие этих возбужденных атомов / молекул с соседними средами (атмосферный воздух, жидкости, поверхности) приводит к образованию активных частиц и к испусканию излучения электромагнитного спектра: УФ-излучение, видимый свет, тепло, электрические поля (Рисунок 1) [1]



Рисунок 1 - Состав плазмы

Плазма является четвертым состоянием вещества после твердых тел, жидкостей и газов и имеет самую высокую энергию системы (Рисунок 2). [2]. Плазма электрически нейтральна, поскольку сумма положительных и отрицательных зарядов численно равны. Плазму можно разделить на типы в зависимости от давления газа (плазма низкого или атмосферного давления) или по температуре (высокотемпературная и низкотемпературная холодная плазма)

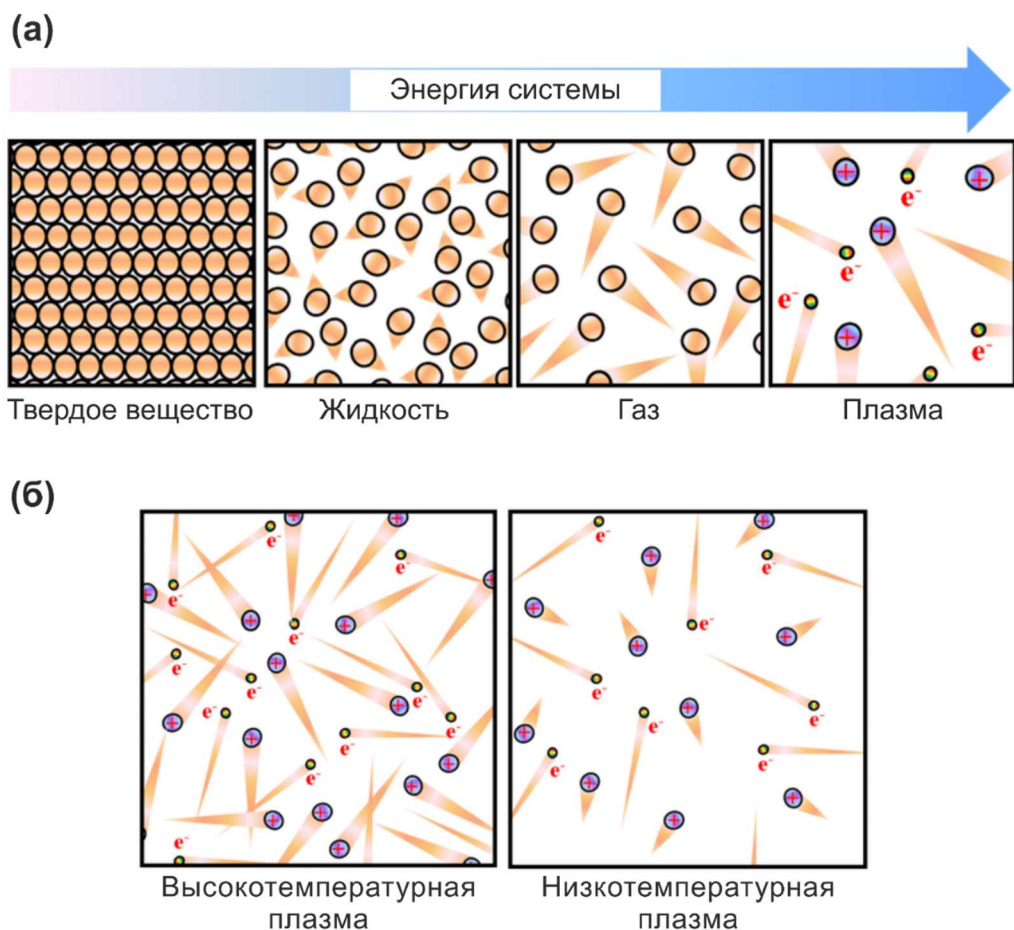


Рисунок 2 - Физическое описание плазмы. а - Схематическая иллюстрация четырех основных состояний вещества. Треугольные хвосты отображают силу теплового движения частиц. б - Схематическое изображение высокотемпературной и низкотемпературной плазмы. Коричневые шарики, фиолетовые шарики и радужные шарики представляют собой нейтральные атомы, положительно заряженные ионы и электроны, соответственно [2]

Холодная плазма атмосферного давления широко изучается в последние десятилетия, поскольку она может генерироваться при атмосферном давлении и температуре до 40°C. Эти свойства позволяют напрямую контактировать плазме с биологическим объектом, не вызывая теплового повреждения тканей [3].

В литературе описано большое количество приборов - генераторов холодной плазмы атмосферного давления. Они различаются механизмами генерации плазмы, геометрией прибора, используемыми газами и возможностями практического применения [4,5]. В настоящее время применяют два основных типа таких устройств: поверхностный или объемный диэлектрический барьерный разряд (ДБР) и плазменная струя (ХПС).

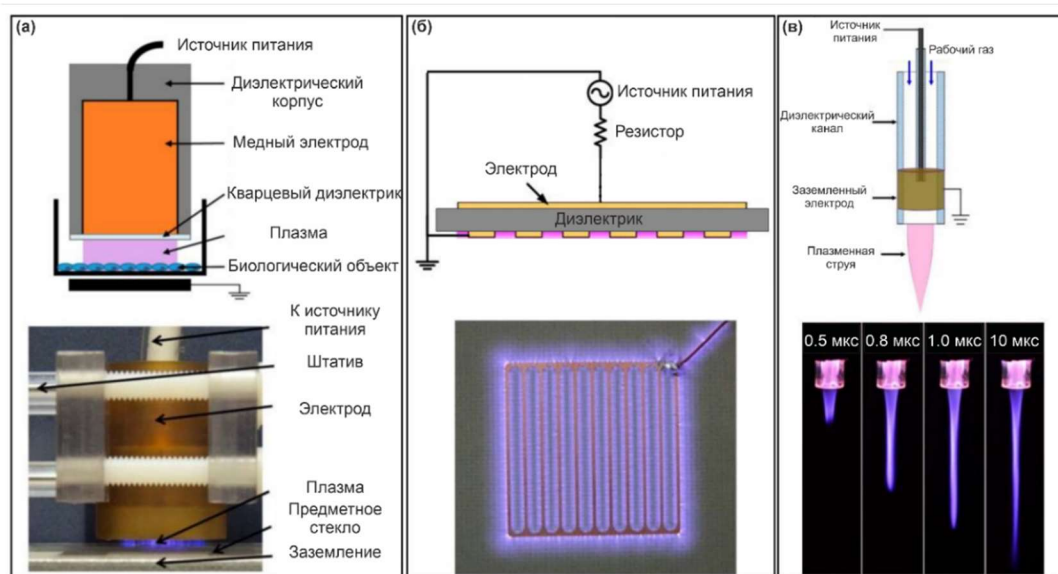


Рисунок 3 - Основные типы генераторов холодной плазмы: а - объемный ДБР, б - поверхностный ДБР, в - ХПС [6]

Помимо различных генераторов холодной плазмы воздействие на биологические объекты могут осуществляться двумя способами – прямым, когда холодной плазмой обрабатывают непосредственно сам объект, и опосредованным – когда плазмой облучают растворы (культуральная среда, буфер), которые далее добавляют к клеткам или вводят в виде инъекций животным.

На настоящий момент показана эффективность ХПС во многих медицинских областях, таких как дерматология [7], стерилизация поверхностей [8], заживление ран [1] и показан большой потенциал в качестве противоопухолевой воздействия [9].

1.1. Действующие частицы

В холодной плазме образуются активные частицы как один из основных путей рассеивания энергии помимо УФ-излучения и тепловой энергии. Количество и состав компонентов можно регулировать при помощи таких параметров, как температура разряда, состав рабочего газа и тип генератора плазмы. Биологический эффект холодной плазмы обусловлен взаимодействием этих частиц с клетками и тканями. Среди веществ, обнаруженных в газовой фазе холодной плазмы, выделяют активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА). К обнаруживаемым АФК относятся перекись водорода H_2O_2 , гидроксильный радикал $\bullet OH$, гидропероксильный радикал $\bullet HO_2$, супероксид-анион-радикал $\bullet O_2^-$, озон O_3 , синглетный кислород O_2 и атомарный кислород O (Таблица 1). АФА включают в себя пероксинитрит $ONOO^-$, пероксинитрат O_2NOO^- , оксид азота NO и

многочисленные производных N_xO_y . В связи с коротким временем жизни детекция многих активных форм затруднена и обычно происходит с помощью косвенных методов.

Таблица 1 - Активные частицы, генерируемых в холодной плазме и их свойства [10]

Название частицы	Свойства и образование	Период полураспада	Биологическая роль
Супероксид-радикал ($\bullet O_2^-$)	Образуется в ходе реакции $O_2 + e^- \rightarrow \bullet O_2^-$ Способен окисляться до кислорода или далее восстанавливаться до перекиси водорода. Встречается в природе при окислении гемоглобина в метгемоглобин.	10^{-5} с в физиологических условиях	Участвует в путях индукции апоптоза HOCl и ONOO [11]. Предшественник в образовании других высокореактивных частиц [12]
Пероксид водорода (H_2O_2)	Относительно стабильная слабая кислота с сильными окисляющими свойствами. Функционирует как клеточный мессенджер, окисляя внутриклеточные тиолы, и играет важную роль в клеточном окислении и развитии рака	> 1 мин в физиологических условиях	Снижает содержание глутатиона в клетке [11] Вызывает перекисное окисление липидов и повреждение белков и ДНК посредством окисления

Продолжение таблицы 1

Название частицы	Свойства и образование	Период полураспада	Биологическая роль
Гидроксил-радикал ($\bullet\text{OH}$)	Самая активная и наиболее короткоживущая из активных форм	$< 10^{-9}$ с в физиологических условиях	Вызывает перекисное окисление липидов клеточной мембраны [11]. Реагирует через отщепление водорода, электрофильное присоединение и радикально-радикальные реакции. Игрет непосредственную роль в инициировании окислительного повреждения макромолекул и непосредственно реагирует со всеми четырьмя азотистыми основаниями.
Синглетный кислород ($^1\text{O}_2$)	Возбужденное состояние молекулы кислорода со спаренными электронами	$10^{-3} - 10^{-6}$ с в зависимости от растворителя	Инактивирует мембранную каталазу, расщепляющую H_2O_2 [11]. Реагирует только с гуанинами. Вызывает окислительный стресс, реагируя с нуклеиновыми кислотами, белками и липидами.
Оксид азота (NO)	Внутриклеточная сигнальная молекула, предшественник высокоокисленных АФА	10^{-10} (оценочно) с в физиологических условиях	Повышает уровни АФА и АФК в клетке и повреждает митохондрии [13]. Важный клеточный мессенджер, важный для функционирования сосудов [14]. Участвует в коагуляции, воспалительных процессах и зависимых от концентрации реакциях с H_2O_2 для контроля апоптоза [12].

Продолжение таблицы 1

Название частицы	Свойства и образование	Период полураспада	Биологическая роль
Диоксид азота ($\text{NO}_2\bullet$)	Радикал оксида азота	$<10^{-6}$ с (оценочно) в физиологических условиях	Быстро реагирует с водой с образованием нитритов и нитратов. Реагирует посредством отщепления водорода, присоединения по связям $\text{C}=\text{C}$, переноса кислорода и электронов и радикально-радикальных реакций
Пероксинитрит (ONOO^-)	Образуется из NO и O_2^-	$< 10^{-6}$ с в физиологических условиях	Участвует в сигнальном пути, индуцирующем апоптоз [11], и может реагировать на активные участки белков, вызывая нитрование и расщепление белков, что приводит к дезактивации ферментов. Истоцает NO [14]
Нитрит (NO_2^-)	Образуется в результате реакций фагоцитоза, стабилен и является хорошим косвенным индикатором концентрации NO .	минуты	Синергическое действие с H_2O_2
Нитрат (NO_3^-)	Образуется в результате реакций фагоцитоза, стабилен и является хорошим косвенным индикатором концентрации NO .	минуты	Сольватация HNO_3 в воде снижает pH за счет реакции гидролиза [15], действует в синергии с другими реактивными частицами, вызывая сильные бактерицидные эффекты [15]

Помимо АФК и АФА, образующихся преимущественно в газовой фазе плазмы, возможно участие активных форм серы в эффекте плазмы на биомисени [16]. Примерами таких форм являются дисульфид водорода H_2S_2 , тиопероксид водорода $HSOH$, сероводород H_2S и цистеин/цистин. Большинство соединений обладают умеренно восстанавливающими свойствами [17]. Эти вещества способны формироваться в растворах или внутри клеток. Многочисленные серные радикалы, например глутатиловые радикалы существуют в физиологических условиях и могут быть получены обработкой плазмой раствора глутатиона или цистеина. Производные тиосульфата и другие частично окисленные дисульфиды могут быть получены обработкой плазмой тиоловых соединений [18,19].

Аналогичным образом можно описать химически активные формы хлора. Они преимущественно состоят из производных Cl_xO_y и хлорных радикалов. Все они являются мощными окислителями и обладают сильным антимикробным действием, а в природе продуцируются миелопероксидазой в гранулоцитах по реакции: $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow H_2O + OCl^-$ [20]. Одна из основных мишеней хлорных радикалов это аминокислоты различных биополимеров и мономеров, модифицируемые до хлораминов. В плазменной медицине эти частицы могут быть получены из производных кислорода и ионов хлора, генерируемых плазмой в определенных условиях [21].

1.2. Транспорт активных частиц

Важным этапом воздействия холодной плазмы на биологический объект является процесс переноса активных частиц к целевому объекту. Особенности и специфичность такого переноса являются темой многочисленных исследований [22,23]. С физической точки зрения важны три различных процесса переноса: перенос химически активных веществ в газовой фазе, процессы переноса на границе раздела фаз и перенос в жидкостях (Рисунок 4).

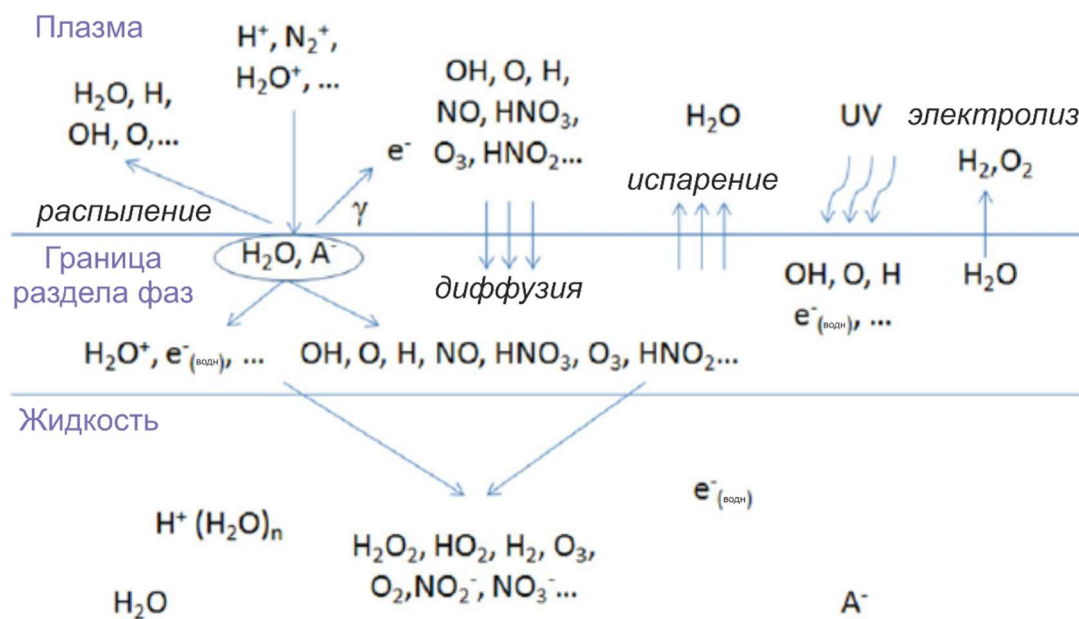


Рисунок 4 - Схема процессов на границе плазма-жидкость [24]

Для биологического применения наибольший интерес представляют процессы, происходящие на границе раздела, а также перенос частиц в жидкости. Граница раздела газ-жидкость представляет собой макроскопическую границу между газовым плазменным разрядом или его выходящим потоком и водной жидкостью или биологической системой. Биологические системы обычно рассматриваются как жидкие поверхности. В межфазном слое происходят следующие процессы: растворение компонентов газовой фазы в жидкости, десольватация компонентов в паровую фазу и химические реакции между частицами газовой фазы и молекулами жидкости или внутри жидкости.

1.2.1. Растворение и перенос веществ в жидкой фазе

Растворение компонентов газовой фазы в жидкостях определяется их растворимостью и полярностью, а также свойствами жидкости. Если свободная энергия Гиббса термодинамической системы уменьшается, может происходить растворение газообразных частиц. Скорость процесса определяется константами закона Генри k с учетом идеальных газов и идеальных растворов [25]. Для частиц, образующихся в плазме, это значение известно для ряда активных форм, и растворимость уменьшается в ряду: $\text{H}_2\text{O}_2 > \bullet\text{NO}_2 > \text{HNO}_2 > \text{HNO}_3 \gg \text{NO} \gg \text{O}_3$. Однако известные константы действительны только для воды и не учитывают реакции поглощения, которые в тканях и тканевых жидкостях могут мешать процессу сольватации.

Что касается объемного переноса жидкости, то сложность заключается в том, что диффузия (или активные процессы переноса) реакционноспособных частиц сильно определяются их реакционной способностью и химическим составом наблюдаемой системы. Такой перенос жидкости является строго нелинейным, и скорости диффузии D часто неизвестны. Для перекиси водорода H_2O_2 параметр D в водных клеточных системах оценивается примерно в $2000 \text{ мкм}^2/\text{с}$, что указывает на быстрое распространение от точки плазменной обработки. Однако присутствие некоторых тиольных групп белков значительно сокращает диапазон распространения H_2O_2 , а фермент утилизации пероксидов пероксиредоксин-2 снижает его с $1,5 \text{ мм}$ до примерно 5 мкм [26]. Другие тиоловые структуры, например, глутатион, практически не вступают в реакцию с H_2O_2 и, соответственно, не влияют на диапазон диффузии H_2O_2 [27,28]. Аналогичным образом, свободная диффузия пероксинитрита $ONOO^-$ оценивается в 50 мкм , но при повышенной концентрации карбоната она снижается примерно до $1-2 \text{ мкм}$ из-за того, что эти ионы вступают в реакцию с образованием высокореакционных пероксомонокарбонатов $\bullet CO_3^-$.

1.2.2. Десольватация активных частиц плазмы при взаимодействии с жидкой фазой

В жидкой фазе помимо растворения, может иметь место также десольватация активных частиц. То есть процесс, при котором многочисленные молекулы H_2O , обладающие достаточным давлением пара, могут быть отделены от жидкой фазы во время облучения. Молекула воды может подвергаться гомолитическому расщеплению в активном плазменном разряде, образуя гидроксильные радикалы $\bullet OH$ и атомы водорода $\bullet H$, что приводит к изменению скорости образования активных частиц [29,30]. Этот эффект используется для изменения состава активных частиц [31,32]. Аналогичного эффекта можно ожидать при обработке систем с высоким содержанием воды, таких как гели агарозы, кровь, культуральная среда или операционное поле при хирургическом вмешательстве. Показано, что при использовании устройств типа ХПС влажность газа оказывает лишь незначительное влияние в отличии от устройств типа ДБР [33]. Роль других молекул, кроме воды, растворенных или диспергированных в водных системах и переносимых посредством испарения или образования аэрозоля в плазменный разряд, до сих пор не исследовалась в плазменной медицине. Большинство органических веществ могут будут ионизированы и / или окислены [34]. Неорганические соли имеют низкое давление пара, поэтому могут взаимодействовать с разрядом плазмы только в виде аэрозоля [35].

1.2.3. Реакции на границе раздела

На границе раздела газ-жидкость адсорбированные частицы сталкиваются с сильным увеличением плотности среды с 0,042 моль/л (идеальный газ) до 55,41 моль/л (вода), сопровождающимся увеличением числа межмолекулярных столкновений. Процессы переноса могут быть медленными по отношению к высокоактивным частицам, таким как радикалы $\bullet\text{OH}$ или атомарный O , со свободным диапазоном диффузии до нескольких микрометров [26]. Этот диапазон еще больше сокращается, если присутствуют потенциальные партнеры, с которыми могут вступать в реакцию эти частицы [36]. Таким образом, на границе раздела происходит накопление активных частиц, что потенциально допускает химические реакции, невозможные в объеме жидкости. Расчеты показывают, что азотная кислота HNO_3 , содержащаяся в одной миллионной доле в газовой фазе, на границе раздела может достигать концентрации 350 ммоль/л, что приводит к снижению рН ниже 3. Такой низкий рН способствует образованию пероксинитрита из H_2O_2 и нитрита NO_2^- или пероксиазотной кислоты из пероксиазотистой кислоты и H_2O_2 [37,38], что невозможно при нейтральном рН буферной основной жидкости. Обе химически активные формы азота обладают высокой реакционной способностью и преобразуются в радикал оксида азота $\bullet\text{NO}_2$ или гидропероксильный радикал $\text{HO}_2\bullet$. Помимо АФА, некоторые реактивные формы кислорода, генерируемые плазмой, особенно активны на границе раздела. Среди них выделяют синглетный кислород с периодом полураспада 20 мкс в воде и атомарный кислород O . Хотя роль синглетного кислорода в химии жидкости после облучения плазмой изучена мало, показано, что атомарный O присутствует в газовой фазе [39,40]. Экспериментально показано, что атомарный кислород имеет большое влияние на биологические системы, а также на химические вещества, присутствующие в жидкости [41–43]. Кроме того, атомарный O оказывал влияние на пролиферацию клеток млекопитающих только в том случае, если в растворе присутствовали ионы хлора Cl^- . Это говорит о том, что атомарный O реагирует с ионами Cl^- с образованием гипохлорита OCl^- с высокими окислительными способностями. Из-за своей нестабильности образующийся OCl^- со временем в растворе распадается на O_2 и Cl^- в условиях комнатной температуры и рН 7.4 [43]. Дальнейшие эксперименты показали, что реакция атомарного кислорода с хлоридом стимулируется высокими концентрациями Cl^- , причем самое эффективное образование OCl^- достигается при самой высокой концентрации Cl^- . Это возможно благодаря эффектам на границе раздела: попадание атомарного кислорода из газовой фазы в жидкую ингибируется образованием OCl^- на границе раздела. После истощения Cl^- , атомарный O не имеет партнера по реакции в используемой жидкости (PBS) и преобразуется в O_2 .

1.3. Воздействие на биомолекулы

Для оптимизации плазменного разряда или постразрядных процессов, например, растворения, желательным является определение точного предшественника химического воздействия струйного потока в жидкостях. Если смотреть с биомедицинской точки зрения, достаточно знать, какой вид химического воздействия был вызван плазменной обработкой. Таким образом, следует рассмотреть, как влияет холодная плазма на основные химические биополимеры клетки: белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и липиды.

1.3.1. Аминокислоты, пептиды и белки

Помимо α -аминогруппы и карбоксильной группы 22 протеиногенных аминокислоты имеют различные химические группы боковых радикалов: алифатические, полярные, азотсодержащие, тиоловые или ароматические. Такое разнообразие приводит к возможности многочисленных модификаций аминокислот активными частицами холодной плазмы. Модификация аминокислот в составе белка может обуславливать изменения в его функциональной активности. Соответственно, роль активных частиц из плазмы в модификациях аминокислот в составе белка при облучении биологических объектов представляет интерес для исследований холодной плазмы.

Для упрощения модельной системы чаще всего изучают воздействие холодной плазмы на изолированные аминокислоты. При анализе методом масс-спектрометрии высокого разрешения результатов воздействия струи гелиевой плазмы на свободные аминокислоты в водном растворе [44] показано, что химической модификации подвергаются 14 из 20 аминокислот: происходит гидроксилирование и нитрование ароматических колец в тирозине, фенилаланине и триптофане (Рисунок 5); сульфирование и образование дисульфидных связей тиоловых групп в цистеине; сульфоксидирование метионина и амидирование и раскрытие пятичленных колец в гистидине и пролине. Таким образом, показано сильное влияние холодной плазмы на аминокислоты, с преобладанием реакции окислительного присоединения. Некоторые обнаруженные продукты взаимодействия аминокислот с компонентами плазмы не имеют прямого влияния на клеточный метаболизм или передачу сигналов, например полигидроксилированные разветвленные аминокислоты, в то время как другие, например нитрозилированный тирозин являются важными молекулами в передаче редокс-сигналов у растений и животных [45,46].

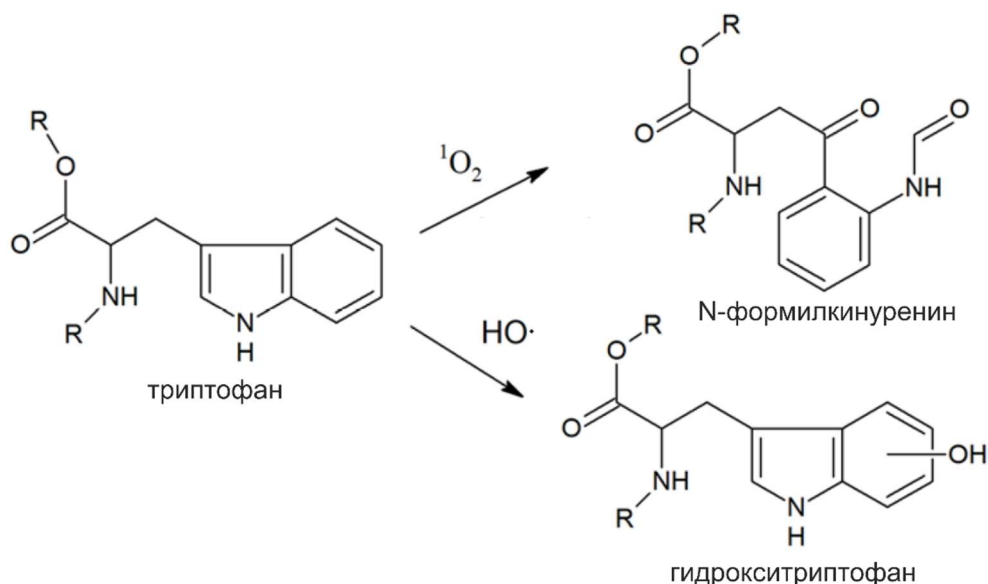


Рисунок 5 - Взаимодействие триптофана с АФК [47]. В зависимости от активной частицы происходит раскрытие ароматического кольца или гидроксильное

Нитротирозин был обнаружен в качестве продукта воздействия на тирозин струей аргоновой плазмы, что указывает на то, что такая модификация тирозина не зависит от рабочего газа [43,48]. Помимо тирозина, нитрозилированию могут подвергаться остатки цистеина в составе белков с участием S-нитрозоглутатиона [49]. Моделирование методами молекулярной динамики предсказывает присутствие S-нитрозилированных продуктов как цистеина, так и глутатиона после обработки плазмой; такие продукты будут нестабильны во время дальнейшего воздействия образованных из плазмы веществ и вступят в реакцию с термодинамически предпочтительными «конечными продуктами», такими как соответствующие производные сульфоновой кислоты [18,19].

Растворы отдельных аминокислот, например цистеина, были предложены как модели для стандартизации используемых в исследованиях генераторов холодной плазмы по составу активных частиц [19] по интенсивности модификаций и выходу активных веществ. Используя масс-спектрометрию высокого разрешения и FTIR, было идентифицировано более 25 возможных продуктов модификации цистеина. На репертуар продуктов влияли источник плазмы, состав рабочего газа и время обработки. Молекулярно-динамическое моделирование показало, что тиоловая группа будет преимущественно модифицироваться с образованием в качестве основных продуктов S-нитрозоцистеина, цистеинсульфеновой кислоты и цистина (Рисунок 6).

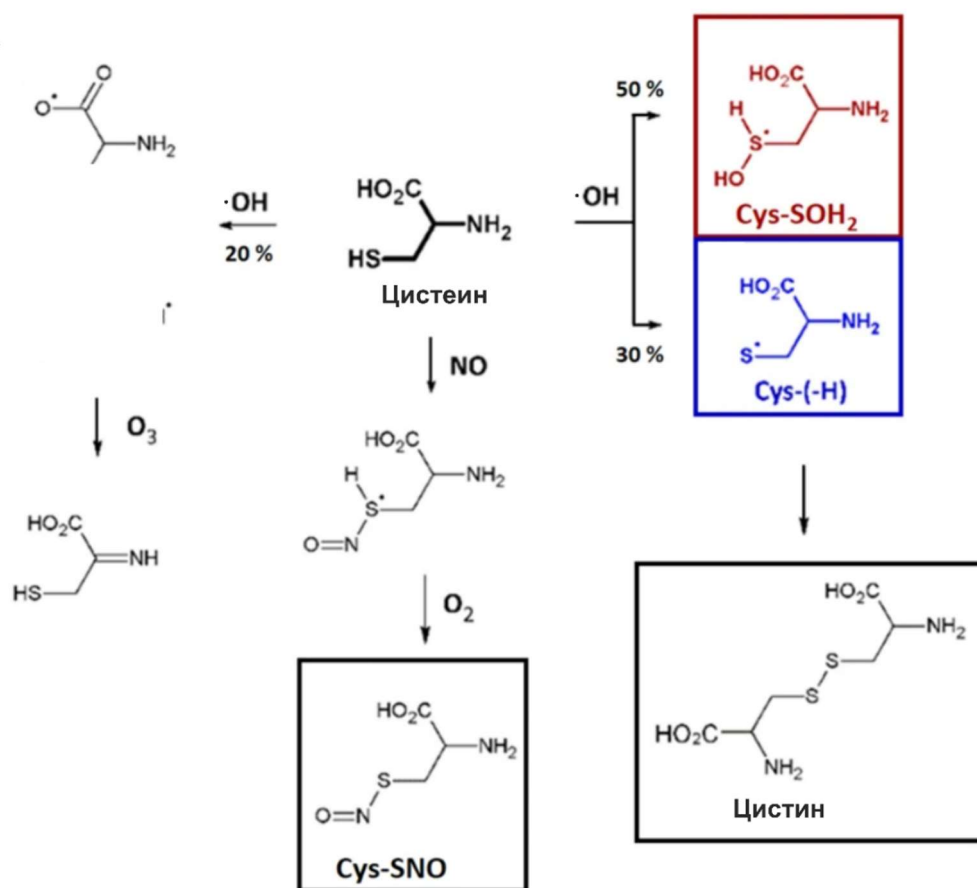


Рисунок 6 - Реакции, возникающие при окислении цистеина. Черным прямоугольником выделены стабильные продукты окисления. Важные промежуточные продукты отмечены цветными прямоугольниками. Поскольку при взаимодействии цистеина с радикалами OH образуется несколько продуктов реакции, выходы представлены на рисунке [19].

Дальнейшая атака гидроксильными радикалами приводит к получению цистеинсульфиновой кислоты, цистеинсульфоновой кислоты и дидегидросоединений цистеина, все из которых были обнаружены экспериментально. Помимо этого, были обнаружены различные цистин-S-оксиды. В результате длительных обработок в присутствии примесей кислорода в инертном газе минорными продуктами были цистеинсульфоновая кислота, аланин и сульфат. Таким образом, дисульфидные мостики, сформированные остатками цистеина, с серой со степенью окисления +1 могут быть легко расщеплены активными формами кислорода и азота из плазмы.

Помимо растворов аминокислот, пептиды или пептидные фрагменты были использованы для оценки влияния струи гелиевой плазмы на биополимеры. Результаты экспериментов частично соответствовали результатам подобного воздействия на аминокислоты, когда преимущественным результатом воздействия было окисление.

Используя в качестве модельных пептидов семизвенный фрагмент ангиотензина и девятизвенный фрагмент брадикардина, молекулярно-динамическое моделирование предсказало атаку остатков Asp, Pro, Ser и Tyr гидроксильными радикалами [50]. Масс-спектрометрия выявила несколько ковалентных продуктов модификации этих пептидов, содержащих один или два дополнительных атома кислорода, что позволяет заключить, что облучение плазмой действительно модифицирует молекулу пептида.

Эффект холодной плазмы на полноразмерные белки активно изучается в настоящее время. Так после облучения струей гелиевой плазмы раствора лизоцима, фермента с бактерицидной активностью, его активность снижалась [51]. Эффект сохранялся при исключении воздействия теплопередачи и ультрафиолетового облучения, что свидетельствует о функциональной значимости химического состава плазмы в наблюдаемом эффекте, а именно АФА и АФК. С помощью MALDI-TOF анализа показано небольшое увеличение молекулярной массы лизоцима, которое, вероятно, отражает ковалентное добавление функциональных групп к боковым группам аминокислот. В аналогичных экспериментах была показана инактивация пероксидазы хрена, фермента, содержащего гемовую группу [52]. Стримерный разряд разрушал его протетическую группу, что привело к потере функциональной активности и увеличению свободных ионов железа в растворе. Наиболее вероятно, что H_2O_2 , OH-радикалы и УФ-облучение вносят основной вклад в модификацию гемовой группы и приводят к наблюдаемым изменениям в белке. Существенные изменения наблюдались во вторичной структуре гемоглобина и миоглобина после облучения гелиевой ХПС [53]. Оба белка не имеют дисульфидных связей, поэтому расщепление через цистин-S-оксиды невозможно. Предполагают, что изменения могут происходить преимущественно вблизи гемовой группы, возможно, посредством реакции Фентона, катализируемой центральным атомом железа.

Для фермента липазы напротив, сообщалось об увеличении активности после обработки струей гелиевой плазмы [54]. Молекулярная масса белка после обработки не изменилась, но были выявлены изменения в спектре кругового дихроизма белка, что говорит о конформационных изменениях, которые увеличивают доступность гидролитического центра.

Lackmann с коллегами исследовали влияние микроразрядного генератора холодной плазмы атмосферного давления с использованием гелия и кислорода в качестве рабочего газа на глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу [55]. После облучения наблюдалась быстрая инактивация ферментативной активности. Масс-спектрометрия продуктов реакции выявила окисление цистеиновых фрагментов в каталитическом центре до

цистеинсульфоновой кислоты. Также была показана инактивация РНКазы А холодной плазмой. Было установлено, что причиной инактивации является чрезмерное окисление цистеина с образованием цистеинсульфоновой кислоты и разрыв дисульфидных связей [56]. В исследовании воздействия струи аргонокислородной радиочастотной плазмы на калицивирус кошек было обнаружено, что белки внешнего капсида окисляются обработкой преимущественно по His, Met, Trp и Pro, образуя, например, триптофандион или формилпролин [57]. В качестве активных частиц, модифицирующих эти аминокислоты, наиболее вероятно в реакцию вступали синглетный кислород, озон и гидроксильные радикалы.

1.3.2. Углеводы клетки как мишени холодной плазмы

Углеводы, выступающие в качестве первичных метаболитов или энергетических депо, широко распространены в большинстве типов клеток. Они являются частью протеогликанов, которые образуют водные гели во многих соединительных тканях животных и человека, и могут встречаться в виде гликокаликса [58–60]. Несмотря на высокую представленность различных углеводов в клетках и тканях опубликовано лишь несколько исследований по воздействию холодной плазмы на углеводы, в основном сосредоточенных на применении плазмы для стерилизации продуктов в пищевой промышленности. Обработка холодной плазмой микрокристаллической целлюлозы и последующий водный гидролиз привели к увеличению выхода глюкозы, вероятно, за счет снижения степени полимеризации и / или подкисления жидкости [61]. Точно так же холодная плазма была предложена в качестве модификатора крахмала для промышленного производства продуктов питания [62]. Авторы утверждают, что крахмал можно модифицировать посредством сшивания и деполимеризации. Напротив, олигосахариды фруктозы в апельсиновом соке не подвергались значительному расщеплению при обработке диэлектрическим барьерным разрядом [63].

1.3.3. Липиды

Липиды клеточной мембраны являются первой структурой, взаимодействующей со струей холодной плазмы при облучении. Они могут быть чувствительны к окислению, особенно когда имеют одну или несколько двойных связей. Аллильная позиция легко может быть атакована радикалами, например молекулярным или синглетным кислородом. В настоящее время предпринимаются попытки картировать сложный липидный состав клеток и тканей млекопитающих с помощью масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения [64]. Расшифровка спектра продуктов окисления липидов лимитирована, в основном из-за ограничений программного обеспечения и трудностей с ионизацией

нейтральных коротких липидных фрагментов [65]. Поэтому для исследования влияния активных частиц плазмы на липиды, были использованы модельные структуры, такие как липосомы фосфатидилхолина. Maheux с коллегами описали воздействие разряда гелиевой плазмы на 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин липосомы, нагруженные 5,6-дикарбоксифлуоресцеином [42]. В зависимости от условий облучения изменялась структура и функциональность липосом. MALDI-MS анализ выявил добавление кислорода и хлора к липидам липосом, которое объясняли образованием $OSCl^+$ во время обработки в присутствии ионов хлора. Авторы предполагают электрофильное присоединение хлорноватистой кислоты к двойным связям, присутствующим в остатках олеиновой кислоты, с образованием α , β -хлоргидринов. В клеточных мембранах из красных кровяных телец образование хлоргидринов наблюдали при действии $OSCl^+$, что в конечном итоге нарушало функциональность мембран [66]. Так, для плазменных разрядов, создающих достаточное количество атомарного кислорода, и в условиях, когда хлорид-ионы присутствуют в большом количестве, образование хлоргидрина в клеточных липидах может происходить *in vivo*, что приводит к функциональным нарушениям. Кроме того, предполагают, что окисление липидной цепи с помощью гидроксильных радикалов в плазматической мембране увеличивает проницаемость клеточной мембраны, особенно в сочетании с воздействием электрических полей [67]. Эксперименты, показывающие увеличение проницаемости мембраны после обработки плазмой, подтвердили такое предположение [68].

В работе [69] методами молекулярной динамики было предсказано, а после с использованием флуоресцентного красителя лаурдана и масс-спектрометрии высокого разрешения показано окисление фосфолипидов активными частицами, генерируемыми плазмой. Атака гидроксильными радикалами приводит к расщеплению боковой цепи жирных кислот по двойной связи, образуя C_9 угольные кислоты и альдегиды. Suda с коллегами продемонстрировали снижение латеральной подвижности бислоев фосфатидилхолина, непосредственно обработанных плазмой, предположительно из-за нежелательных процессов полимеризации [70]. Такие результаты указывают на потенциальные риски применения плазмы в медицине. В сельском хозяйстве и пищевой промышленности, где холодная плазма используется для противомикробной обработки, окисление липофильных соединений является лимитирующим фактором при выборе интенсивности облучения [71].

1.3.4. Нуклеиновые кислоты

Дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) и рибонуклеиновые кислоты (РНК) являются одними из основных клеточных биомолекул. Ароматические гетероциклы азотистых оснований являются структурами богатыми электронами, которые легко подвергаются окислению и другим модификациям, что потенциально несет угрозу для гомеостаза и деления клетки.

Существующие данные по влиянию холодной плазмы на ДНК весьма противоречивы. Некоторые авторы описывают серьезное влияние на целостность нуклеиновых кислот [72], в то время как другие не отмечают негативного воздействия на нуклеиновые кислоты, ведущие к функциональным нарушениям [73]. Это противоречие связано с огромным разнообразием источников плазмы с их различными химически активными компонентами и выходом УФ-излучения, а также вариацией подходов, используемых для оценки эффектов, связанных с плазмой. В частности, в более ранних экспериментах как модель использовались ДНК плазмид в водных бессолевых растворах, что приводило к значительному повреждению остова нуклеиновой кислоты [74]. В последующих экспериментах на клетках не было показано необратимого повреждения ядерной ДНК обработкой ХПС.

Одной из существенных проблем в изучении влияния ХПС на ДНК является выбор метода детекции повреждений ДНК. Наиболее популярным методом является оценка изменения уровня фосфорилирования гистонового белка H2AX, что свидетельствует о двуцепочечных разрывах в ДНК. Однако связь между фосфорилированием, повреждениями в ДНК и гибелью клеток довольно сложна, чтобы говорить о цитотоксическом воздействии плазмы на клетку вследствие таких повреждений в ДНК. Если повреждение ДНК является слишком обширным и, следовательно, необратимым, оно может привести к апоптозу, но и апоптоз может быть вызван и другими внутренними и внешними триггерами, что в конечном итоге может привести к фрагментации ДНК, сопровождаемой повышенным фосфорилированием H2AX [75].

Данные о взаимодействии плазмы и нуклеиновых кислот были подробно рассмотрены в работе Arjunan [76] (Рисунок 7).



Рисунок 7 - Влияние холодной плазмы на изолированную и клеточную ДНК [76]

Исследования на модельной ДНК показали, что холодная плазма вызывает разрывы цепей ДНК, появление димеров внутри цепи и модификацию оснований. В прокариотических клетках облучение холодной плазмой индуцирует димеризацию тимина и окисление оснований ДНК, что приводит к образованию 8-ОНдG. В зависимости от степени повреждения ДНК, в клетке инициировалась или репарация повреждений, или гибель клеток. В эукариотических клетках в ответ на повреждение ДНК после обработки плазмой происходила индукция апоптоза, процессов репарации ДНК или остановка фазы клеточного цикла в стадии G2/M. Инкубация клеток холангиокарциномы WRH-1 и PC-3 со средой, облученной плазмой, приводит к двухцепочечным разрывам ДНК [77], которые также обнаруживаются после обработки культуральной средой, облученной плазмой по фосфорилированию гистона H2AX в самых внешних клеточных слоях сфероидов при использовании сфероидов клеток аденокарциномы как модели опухоли [78]. При добавлении в среду фермента каталазы, катализирующий разложение перекиси водорода, повреждения ДНК переставали детектироваться, что указывает на роль H₂O₂ в этом процессе [78,79]. Также показано, что добавление D-маннита (инактиватора •ОН) и фермента супероксиддисмутазы, катализирующей превращение •O₂⁻ до кислорода и перекиси водорода, к культуральной среде, обработанной плазмой, также снижают уровень повреждения ДНК, то есть •O₂⁻ и •ОН участвуют в повреждении ДНК, индуцируемом холодной плазмой [78].

1.4. Внутриклеточный ответ на воздействие ХПС

1.4.1. Активные вещества холодной плазмы взаимодействуют с ферментами клеточных мембран

Во время обработки клеток и тканей холодной плазмой мембраны клеток и органелл представляют собой естественную интерфазу, которая первой вступает в контакт с АФК и АФА. Мембраны позволяют переводить химическую реактивность АФК и АФА в различные биологические реакции. Согласно исследованиям Вауег с соавторами, опухолевые клетки защищены от передачи межклеточных сигналов, индуцирующих апоптоз, за счет гиперэкспрессии мембраноассоциированных каталазы и супероксиддисмутазы [80]. Ни одни из долгоживущих частиц, обнаруженных в культуральной среде, обработанной плазмой, таких как нитрит, H_2O_2 , OCI^- или NO , по-видимому, не способны влиять на зависимый от каталазы контроль передачи сигналов, индуцирующих апоптотическую гибель клеток. Тем не менее индукция апоптоза возможна, когда активные частицы последовательно активируют многоступенчатый процесс (Рисунок 8).

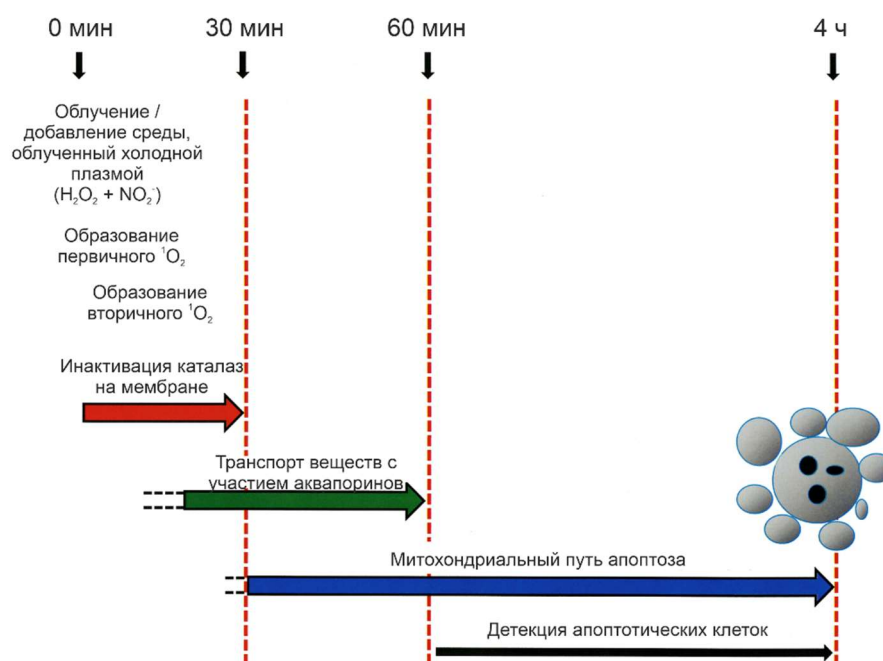


Рисунок 8 - Этапы индукции апоптоза в опухолевых клетках за счет синергетического эффекта между H_2O_2 и нитритом [81]

Первая стадия включает образование первичного синглетного кислорода (1O_2) в результате сложного взаимодействия между пероксинитритом NO_2^- и H_2O_2 [82]. Затем 1O_2 инактивирует часть связанных с мембраной молекул каталазы на опухолевых клетках. Следовательно, H_2O_2 и пероксинитрит, которые непрерывно продуцируются опухолевыми

клетками [83] и обычно разлагаются мембрано-ассоциированной каталазой, сохраняются на месте локально инактивированной каталазы [81]. Когда часть молекул каталазы инактивирована в этих опухолевых клетках, функциональные внеклеточные H_2O_2 и $ONOO^-$ образуют вторичную активную молекулу 1O_2 [81,84]. Молекулы синглетного кислорода продолжают инактивировать каталазу на облученных и соседних клетках посредством аутоамплификационного распространения вторичного синглетного кислорода. Таким образом, первичные активные частицы являются лишь “спусковым крючком” для активации аутоамплификационных механизмов в опухолевых клетках. Воздействие холодной плазмы первоначально инактивирует только небольшой процент молекул каталазы, связанных с мембраной в опухолевых клетках [85]. При инактивированном активном центре каталазы пероксид водорода H_2O_2 , как продуцируемый холодной плазмой, так и являющийся продуктом жизнедеятельности клетки, проникает в клетку через каналы, сформированные аквапоринами, и вступает в реакцию с остатками цистеина белков и глутатионом, что приводит к истощению клеточного глутатиона [81]. Этот процесс снижает защиту клеток от перекисного окисления липидов и повышает чувствительность клеток к индукции апоптоза [84,85]. Оптимальная инактивация каталазы, таким образом, по-видимому, обеспечивает эффективную индукцию гибели клеток через сигнальный путь НАДФН-оксидазы 1 (NOX1), регулируемой $HOCl$, и завершается перекисным окислением липидов [85]. Было показано, что холодная плазма вызывает повышенное перекисное окисление липидов и продукцию оксида азота в клетках меланомы B16 по сравнению с здоровыми клетками L929 [86].

1.4.2. Холодная плазма влияет на целостность и проницаемость мембран и их способности к эндоцитозу

Изменения клеточных мембран, вызванные воздействием холодной плазмы, существенно влияют на их функции. Компьютерное моделирование показывает, что облучение холодной плазмой должно приводить к окислению бислоя фосфолипидов, тем самым снижая барьер свободной энергии для транслокации различных веществ в клетку по сравнению с неокисленным бислоем [87]. Было показано, что обработка ХПС усиливает транслокацию из клеток низкомолекулярного АТФ, а также молекул размером до 150 кДа через цитоплазматическую мембрану [88–90]. При этом показано, что эффективность транслокации при использовании культуральной среды, обработанной плазмой, зависит от типа клеток, в отличие от случая прямого облучения [88]. Повышение проницаемости мембран клеток остеосаркомы человека (U-2 OS, MNNG-HOS) [89,90] и глиобластомы U373MG [91] было подтверждено экспериментально после облучения холодной плазмой.

Обработанные холодной плазмой клеточные мембраны могут попадать внутрь клетки путем клатрин-зависимого эндоцитоза [91,92]. Показано, что ХПС-стимулированная репарация мембраны за счет эндоцитоза ускоряет захват декстрана и некоторых наночастиц [89,90].

Модель, основанная на дифференциальной экспрессии аквапоринов в опухолевых и здоровых клетках, была предложена для объяснения того, почему раковые клетки реагируют на облучение холодной плазмой большим повышением внутриклеточных АФК, чем нормальные клетки. А именно, раковые клетки экспрессируют больше аквапоринов на своих цитоплазматических мембранах, что приводит к тому, что скорость поглощения H_2O_2 в раковых клетках выше, чем в нормальных клетках, что после обработки холодной плазмой приводит к более быстрой гибели раковых клеток. Из-за различий в белковом составе мембран, клетки глиобластомы действительно потребляют H_2O_2 намного быстрее, чем здоровые астроциты [93], что подтверждает селективность модели, основанной на аквапоринах.

1.4.3. Изменение потока ионов и рН влияют на митохондрии и эндоплазматический ретикулум

Нарушения мембранного транспорта серьезно влияют на состав цитоплазмы и функцию различных органелл. Было показано, что повышенная внутриклеточная концентрация АФК в клетках, обработанных ХПС, снижает внутриклеточный рН [94]. Как внутриклеточные АФК, так и изменение рН влияют на транспорт Ca^{2+} . ХПС вызывает большой приток Ca^{2+} в клетки меланомы при кислом рН, чем в физиологических условиях. Поскольку ХПС-индуцированное увеличение Ca^{2+} в цитоплазме происходит в клетках меланомы даже в отсутствие дополнительного внеклеточного кальция, это указывает на то, что цитоплазматическое увеличение Ca^{2+} происходит из внутриклеточных запасов в результате его перераспределения между компартментами клетки, то есть за счет выхода Ca^{2+} из органелл. Показано, что эндоплазматический ретикулум и митохондрии вовлечены в этот процесс [95].

Образование NO внутри клеток, вызванное обработкой ХПС, также зависит от рН таким образом, что в кислых условиях происходит усиленное нитрование белков. АФК и рН влияют на ионные насосы, проницаемость митохондриальной мембраны и потенциал митохондриальной мембраны [96]. ХПС изменяет динамику внутримитохондриального H_2O_2 и супероксид-анионов, т.е. ритм и форма колебаний АФК нарушаются инфузией H_2O_2 [97]. Согласно компьютерному моделированию, холодная плазма критически влияет на основные функции митохондрий, которые, в свою очередь, влияют на внутриклеточную

окислительно-восстановительную передачу сигналов, метаболическое взаимодействие и направление клеточной «судьбы» к выживанию или смерти [97]. Более того, облучение холодной плазмой снижает уровни глутатиона (GSH) в клетках, приводит к потере митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi$) и высвобождению цитохрома c, что приводит к гибели клеток. Предварительная обработка клеток антиоксидантом N-ацетил-L-цистеином (NAC) резко снижает гибель клеток, облученных холодной плазмой [98]. Нарушение целостности митохондриальной мембраны в клетках, обработанных холодной плазмой [96], приводит к снижению продукции АТФ и подавлению сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR и RAS/MEK [99]. В случае эндоплазматического ретикулума, холодная плазма индуцировала Nrf2-опосредованный ответ на окислительный стресс ЭПР, активацию пути PPAR-альфа/RXR и избыточную продукцию пероксисом в облученных клетках [100].

1.4.4. Облучение холодной плазмой влияет на содержание ядерной ДНК и репликативную/транскрипционную активность

Как уже было описано выше, холодная оказывает влияние на целостность оснований в ДНК, процессы репликации и экспрессии генов, предшествующие активации путей выживания или гибели. Показано, что в клетках меланомы облучение ХПС вызывало повреждение ДНК и способствовало остановке клеточного цикла в фазе Sub-G1 [101].

В клетках, обработанных ХПС, появление разрывов ДНК сопровождается повышенным фосфорилированием и активацией основных белков-регуляторов клеточного цикла - киназ контрольной точки CHK1/2 и митоген-активируемых киназ (МАР), повышенной экспрессией сигнальных эффекторов МАР-киназы, например, белка теплового шока Hsp27, эпителиальных факторов роста и ряда цитокинов, таких как интерлейкины -6, -8 [102]. На модели клеток кератиноцитов человека HaCaT показано, что облучение ХПС вызывает фосфорилирование серин- (ATM) и серин / треонин-протеинкиназы (ATR), где ATM действует как прямой окислительно-восстановительный датчик, стимулируя фосфорилирование белка p53 и последующую его транслокацию в ядро [77,102]. Далее происходит фосфорилирование Rad17, высвобождение цитохрома c из митохондрий и активация каспазы-3 [101] что приводит к остановке клеточного цикла и гибели клеток по каспаз-зависимому пути.

С точки зрения транскрипционного ответа на облучение, ХПС изменяет экспрессию более 900 генов, которые вовлечены в 40 различных путей, из которых многие взаимосвязаны с p53 [103]. Для установления роли H_2O_2 в эффекте ХПС на транскрипционную активность, сравнивали дифференциальную экспрессию генов в

клетках U937 и SK-mel-147 после облучения ХПС и после инкубации с H_2O_2 . Было обнаружено, что только 4 и 2 гена, соответственно, из нескольких сотен выявленных для этих клеток дифференциально экспрессируются и для H_2O_2 и для ХПС, указывая на то, что активные компоненты плазмы, ответственные за регуляцию большинства ХПС-зависимых генов отличны от H_2O_2 [104]. Обработка ХПС также снижает экспрессию нескольких факторов транскрипции, включая c-FOS [105] и Yes-ассоциированный белок YAP [106].

Помимо мРНК, показано влияние ХПС на экспрессию малых некодирующих РНК (snRNAs, miRNAs). В клетках рака легкого A549, обработанных ХПС, происходила позитивная регуляция экспрессии miR-203a. Функционально, miR-203a ингибирует пролиферацию путем взаимодействия с геном ингибитора апоптоза BIRC5 [107].

Помимо прямого воздействия на ДНК, облучение ХПС также вызывает эпигенетические изменения в клетках. Было показано, что в клетках рака молочной железы MCF7 обработка ХПС изменила уровень метилирования 899 генов [108]. Под действием ХПС увеличивалась экспрессия гистоновой деметилазы, а также снижение экспрессии онкогенов HSCB и PRPS1. Эффект гипометилирования CpG сайтов в ДНК, вызванный облучением ХПС, наблюдался в клетках гормон-независимого рака молочной железы MDA-MB-231 и отсутствовал в гормон-зависимых клетках MCF7 [109], что указывает на то, что плазма индуцирует эпигенетические и клеточные изменения в зависимости от типа опухолевых клеток.

1.4.5. Холодная плазма влияет на содержание метаболитов в цитоплазме

В работе [110] облучали культуральную среду без пирувата и культуральную среду с пируватом и добавляли к клеткам остеосаркомы SaOS-2. Было показано, что в случае культивирования клеток в облученной среде без пирувата, концентрация H_2O_2 увеличивается в 10-100 раз, вызывая усиленный цитотоксический эффект. В стандартных условиях пируват натрия используют как добавку к культуральной среде, позволяющую клеткам повысить эндогенную выработку двуокиси углерода и, соответственно, снизить зависимость клеток от внешнего CO_2 . Для клеток острого миелоидного лейкоза MOLM13, обработанных ХПС, показано изменение метаболизма аланина, аспартата, d-глутамина и d-глутамата. После облучения ХПС снижалась активность глутаминазы, что приводило к накоплению внутриклеточного глутамина и гибели лейкозных клеток [111]. Применение газовой хроматографии с последующей масс-спектрометрией показало, что обработка клеток эндотелия НМЕС-1 ХПС приводит к снижению концентрации ксантозина и пролина, а также подавлению пути метаболизма аланина, аспартата, глутамата и пурина в этих клетках [112]. Обработка клеток множественной миеломы LP-1 холодной плазмой

привела к изменению метаболизма бета-аланина, пропаноата и линолевой кислоты [113]. Снижение аланина также наблюдали при анализе метаболомного профиля клеток глиобластомы человека U251SP, инкубированных с раствором Рингера, обработанным ХПС. Такое снижение сопровождалось повышением образования ацетил-КоА, участвующего в анаболизме липидов из аланина и аспарагина [114]. Таким образом, в большинстве исследований показано влияние ХПС на метаболизм аланина.

1.5. Влияние холодной плазмы на основные клеточные процессы.

Все упомянутые нарушения жизненно важных клеточных компонентов - мембран, цитоплазмы и органелл - оказывают сильное влияние на судьбу клеток. В живой клетке, которая не находится в терминальной фазе дифференцировки, будет либо происходить репликация генетического материала с последующим делением, либо клетка будет находиться в состоянии относительного покоя в интерфазе клеточного цикла. Если такая клетка сталкивается с какими-либо сигналами стресса, изменяется регуляция процессов пролиферации и миграции, и далее будут активированы процессы, направленные на выживание клеток или процессы, способствующие гибели клеток (Рисунок 9).

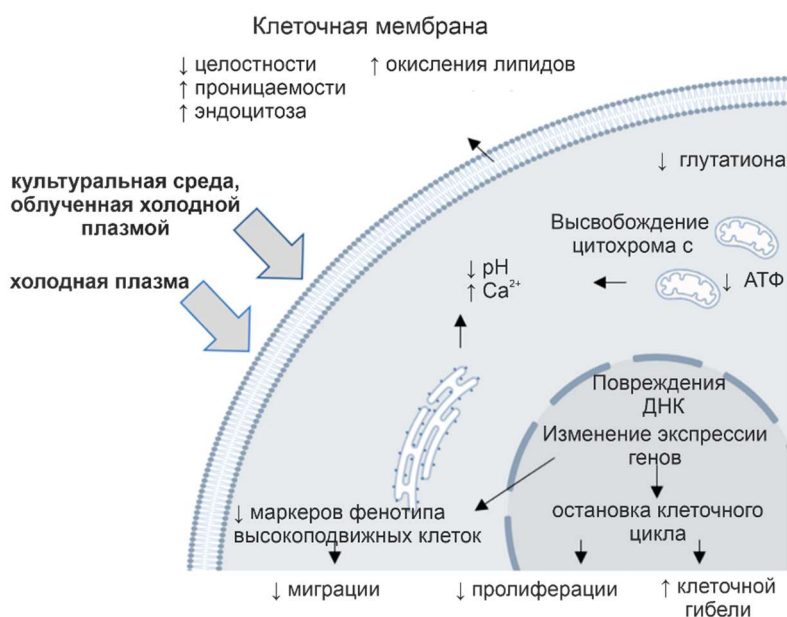


Рисунок 9 - Внутриклеточные изменения, вызываемые холодной плазмой [115]

1.5.1. Пролиферация

Сильный антипролиферативный эффект холодной плазмы был показан на опухолевых клеточных линиях различного гистологического происхождения: хондросаркоме CAL-78, SW1353 [89], аденокарциноме A549 и карциноме H1299 легкого

человека [107], остеосаркоме U2-OS и MNNG, фибробластах 3T3, кератиноцитах HaCaT [116], глиобластоме U251C [106] и миобластах C2C12 [117].

При исследовании влияния ХПС на процессы, связанные с клеточным циклом, показано увеличение экспрессии белка γ H2AX, который является индикатором нарушения S-фазы клеточного цикла [118]. Также показано, что после облучения ХПС процент клеток, находящихся в фазе G2/M, увеличивается, и происходит остановка фазы клеточного цикла в стадии G2/M [117]. Поскольку раковые клетки обладают высокой скоростью пролиферации, что соответствует высокой доле клеток в S-фазе, облучение ХПС снижает их жизнеспособность за счет остановки клеточного цикла в точке G2/M дозозависимым образом. Такого эффекта не было отмечено для здоровых клеток [119].

1.5.2. Миграция

При исследовании влияния ХПС на миграционный и инвазивный потенциал раковых клеток в качестве моделей были использованы различные опухолевые клетки. Обработка ХПС различных клеток рака молочной железы человека с использованием различных инертных газов снижала подвижность клеток. Обработка гелиевой плазмой подавляла миграцию и инвазию клеток рака молочной железы MDA-MB-231 [120], а обработка аргоновой холодной плазмой вела к полной потере подвижности клеток MCF7 и MDA-MB-231 [121]. Миграционная и инвазивная активность клеток остеосаркомы D-17 и DSN также снижалась после обработки ХПС [122]. Анализ маркеров миграции раковых клеток (E-кадгерина, YKL-40, N-кадгерина, SNAI1) показал, что облучение ХПС ведет к понижению их экспрессии в клетках меланомы [123]. После обработки многоклеточных сфероидов остеосаркомы человека раствором Рингера, облученным ХПС происходила позитивная регуляция экспрессии маркеров стволовых клеток [124]. Использование ХПС в сочетании с темозоломидом приводило к снижению миграции клеток глиобластомы U87MG за счет увеличения экспрессии интегринов $\alpha\beta 3$ и $\alpha\beta 5$ на поверхности клеток, которые усиливают клеточную адгезию [125]. В ХПС-обработанных клетках миеломы подавление миграционной способности происходило за счет снижения экспрессии металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9 [126], критически важных для деградации внеклеточного матрикса, сдерживающего миграцию.

С другой стороны, непродолжительное воздействие ХПС способствовало увеличению подвижности клеток HT-1080 человека. В этих клетках обработка ХПС стимулировала фибробластоподобный фенотип - удлинение клеток, образование выступов мембраны и увеличение площади поверхности клеток, наряду с продукцией

внутриклеточных АФК и Ca^{2+} [127]. Также было отмечено, что ХПС индуцирует образование оксида азота NO и усиливает миграцию эндотелиальных клеток [128].

1.5.3. ХПС-индуцированная аутофагия

Ингибирование пролиферации или миграции вследствие облучения ХПС, клетки воспринимают как стрессовый стимул и пытаются справиться с ним за счет усиления макро- и микроаутофагии, позволяющей деградировать поврежденные и агрегированные белки в протеосомах с последующим использованием аминокислот для биосинтеза нужных белков. Если уровень аутофагии слишком высок, этот процесс может стать путем гибели клетки. Показано, что инкубации клеток рака эндометрия АМЕС и НЕС50 в среде, облученной ХПС, приводит к гибели клеток по пути аутофагии [129]. Стоит отметить, что для подтверждения активации аутофагии авторы анализировали только молекулярные маркеры аутофагии, без подтверждения процесса методом электронной микроскопии, что является стандартом качества в таких исследованиях. Было показано, что ингибитор аутофагии МНУ1485 частично ингибирует гибель клеток, вызванную культивированием в среде, облученной ХПС, что также косвенно указывает на роль аутофагии в индукции гибели. Аутофагия также наблюдалась при воздействии ХПС на первичные культуры рака простаты, тогда как постоянные линии раковых клеток демонстрировали гибель клеток с активацией маркеров некроза и апоптоза [79]. Характерные для активации аутофагии молекулярные изменения - увеличение уровня мРНК генов аутофагии LC3 и ATG5 - детектировали после облучения клеток меланомы мыши В16, в то время как в нормальных клетках L929 таких изменений не было [86]. Кроме того, после облучения опухолей меланомы В16, показано увеличение уровня указанных мРНК на 5й и 10й дни после облучения ХПС, а также снижение объема опухоли. При облучении ХПС в комбинации с алкилирующим цитостатическим противоопухолевым препаратом дакарбазином эти эффекты усиливались. Для клеток меланомы человека G-361 облучение ХПС и наноэмульсия силимарина запускали аутофагию с активацией путей PI3K/mTOR и EGFR [99].

1.5.4. Гибель клеток вследствие активации старения

Интенсивность стрессового воздействия влияет на молекулярном уровне на выбор пути реагирования: с помощью энергоемких механизмов аутофагии, направленной на выживание клетки или с активацией гибели клеток, или даже с переходом в состояние клеточного старения с низким потреблением энергии. Фаза старения (покоя) позволяет клеткам повторно активировать нормальный клеточный метаболизм при стрессе, при условии, что органеллы и ДНК клетки не повреждены фатально без возможности

восстановления. Было показано, что низкие дозы ХПС активируют процессы старения в клетках меланомы, что подтверждается положительной иммунофлуоресценцией белка H3K9, позитивным окрашиванием SA- β -Gal и экспрессией p21 [101]. Обработка гелиевой холодной плазмой нормальных фибробластов человека и стромальных клеток жировой ткани, также не вызывает гибели клеток, но приводит к незначительному повреждению ДНК, остановке пролиферации с увеличением экспрессии p53/p21, p16, характерным морфологическим изменениям и секреции провоспалительных цитокинов. В метаболическом плане изменения в облученных клетках сопровождались гликолитическим переключением и увеличением количества митохондрий [130].

1.5.5. ХПС-индуцируемый апоптоз

Программируемая гибель клеток по пути апоптоза может запускаться и внутренними сигнальными путями, которые могут взаимопереключатся на различных уровнях. АФА, генерируемые ХПС, вызывают гибель клеток ТНР-1 лейкоза человека по типу апоптоза при коротком воздействии (1 мин) и по пути некроза при более длительном облучении (3 мин) [131]. При облучении аргоновой плазмой клеток лимфомы человека U937 показано, что примесь азота в рабочем газе увеличивает количество АФА, но доля апоптотических клеток уменьшается [132]. Авторы [133] показали, что именно в случае трижды негативного рака молочной железы, культуральная среда, обработанная ХПС, селективно вызывает апоптоз как *in vitro*, так *in vivo*. Они предположили, что уровень геномных мутаций и уровень гиперактивации путей MAPK / JNK и NF- κ B в клетках трижды негативного рака молочной железы делают их более чувствительными к АФК и АФА облученной культуральной среды. Апоптоз, активированный MAPK-зависимыми путями, был также отмечен в клетках карциномы базального слоя эпителия кожи TE354T после инкубации со средой, облученной ХПС [134], и в клетках меланомы A875, где облучение ХПС увеличивало экспрессию Sestrin2 и активировало нижестоящую передачу сигналов iNOS, Fas и p38 / MAPK [135]. Показано, что в клетках миеломы, облученных холодной плазмой, именно p53-зависимый каскад является ключевым фактором в активации рецептора CD95 и далее соответствующих каспаз [136]. Активация экспрессии p53 наблюдалась в клетках Т-лимфобластного лейкоза Jurkat, обработанных ДБР [137]. Повышенные уровни АФА являются первичными триггерами апоптоза и уровни клеточного глутатиона и пероксидазы имеют решающее значение для ХПС-индуцированной гибели клеток [138].

Что касается активации внутреннего пути апоптоза под действием ХПС, внутриклеточным пусковым механизмом чаще всего служит повреждение ДНК. Так

обработка холодной плазмой увеличивает уровень внутриклеточных АФК и повреждений ДНК в клетках Jurkat [137]. В клетках остеосаркомы обработка ХПС приводит к увеличению экспрессии p53 / phospho-p53 [139], а в клетках рака толстой кишки HT29 и SW480 - к увеличению экспрессии p21 [140], что приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу. Повреждениями ДНК, вызывающими апоптоз, в клетках, обработанных ХПС, было образование 8-оксогуанина, основного продукта окисления ДНК [77]. Также детектировали повышение экспрессии фермента репарации 8-оксогуанина [141] и белка GADD45 α , индуцируемого повреждением ДНК [106]. В клетках рака простаты LNCaP [142], клетках холангиокарциномы [77], эндотелиальных клетках человека HDMEC [143] и клетках меланомы человека G-361 [144] обработка ХПС вызывает активацию каспазы 3/7 и морфологические изменения клеточной архитектуры. Эти изменения сопровождаются повышением уровня PARP и блокированием пути HGF / c-MET [123]. Поскольку ингибиторы каспаз не подавляли гибели ХПС-обработанных клеток, вероятно ХПС способна активировать каспазозависимые типы гибели [145].

1.5.6. Иммунный ответ

Облучение клеток холодной плазмой может вызывать иммунный ответ. Такой ответ может вести к формированию долгосрочного противоопухолевого ответа, если клетки гибнут с признаками иммуногенной клеточной гибели (ICD). ICD характеризуется изменениями в составе белков на поверхности клетки, а также высвобождением растворимых медиаторов, которые действуют как активаторы и стимуляторы созревания на ряд рецепторов, экспрессируемых дендритными клетками, чтобы стимулировать презентацию опухолевых антигенов Т-клеткам и вызывать гибель опухолевых клеток [146]. ICD опосредуется высвобождением молекул - молекулярных паттернов, связанных с повреждениями (DAMP), которые являются сигналами для иммунной системы. Эти молекулы обычно удерживаются внутри клеток и нужны для ее нормального функционирования, но, выходя за пределы клеток, они действуют как сигналы опасности. Список известных DAMP, вовлеченных в ICD, включает кальретикулин, белки теплового шока (HSP) 70 и 90, белок группы высокой подвижности 1 (HMGB1), АТФ, аннексин А1, интерфероны типа I (IFN), митохондриальную ДНК и многие другие [147]. Было показано, что среда, облученная ХПС, увеличивает присутствие кальретикулина на поверхности клетки и высвобождение АТФ во внеклеточное пространство [148]. Воздействие ХПС индуцировало гибель клеток вестибулярной шванномы [149] с экстернализацией кальретикулина и увеличением высвобождения белка HMGB1. Воздействие PBS,

облученного ХПС, на клетки рака простаты вело к усилению секреции TNF- α и IFN- γ , и снижению TGF- β [150].

1.6. Заключение

Холодная плазма – относительно новая и активно развивающаяся отрасль междисциплинарных исследований. Возможности применения в пищевой промышленности, сельском хозяйстве, медицине и других отраслях постоянно расширяются [151–153]. Тем не менее исследования механизмов клеточного ответа на облучение холодной плазмой до сих пор являются большим полем для фундаментальных исследований.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы и оборудование

2.1.1 Реактивы и материалы

В работе были использованы следующие реактивы: культуральные среды IMDM, DMEM, DMEM/F-12, MEM, Нумес, раствор антибиотиков-антимикотиков (10,000 ед./мл пенициллина, 10,000 мкг/мл стрептомицина и 25 мкг/мл амфотерицина В), TrypLE Express Enzyme все производства GIBCO (Life Technologies, Великобритания); натрий-фосфатный буфер PBS (Amresco, США); культуральная среда 199, эмбриональная бычья сыворотка FBS, GlutaMAX™ (GIBCO, Invitrogen, США); 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ), изотиоцианат флуоресцеина (FITC) (Sigma-Aldrich, США); Trizol®, буфер для нанесения ДНК (Thermo Fisher Scientific, США); Matrigel™ (BD Biosciences, США); агароза (Диам, Россия); раствор Рингера (Медполимер, Россия); хлорид натрия (Gerbu, Германия), Трис, ЭДТА (MP Biomedicals, Россия); бромистый этидий (Хеликон, Россия); 2-метилбутанол, 2,2,2-трибромэтанол (Sigma, США); триптон, дрожжевой экстракт, карбонат натрия, бикарбонат натрия (Реахим, Россия); физиологический раствор (Красфарма, Россия); этиловый спирт (Кемеровская фармацевтическая фабрика, Россия); гепарин (Белмедпрепараты, Россия).

Наборы и смеси: набор для проведения полимеразной цепной реакции MasterMix RT SyberGreen (Biolabmix, Новосибирск), набор для изучения апоптоза с Annexin V FITC, PI (BD Biosciences Pharmingen, США), набор для измерения пероксида водорода флуориметрическим методом (Sigma-Aldrich, США), набор реагентов Грисса для измерения нитритов (Promega, США).

Материалы для культивирования клеток: флаконы для культивирования с площадью поверхности 25 см², флаконы для культивирования с площадью поверхности 75 см², 6-луночные планшеты для культивирования с площадью лунки 9 см², 12-луночные планшеты для культивирования с площадью лунки 3.5 см², 96-луночные планшеты для культивирования (TPP, Швейцария); планшеты E-Plates L8 для мониторинга в режиме реального времени на приборе iCELLigence (ACEA Biosciences Inc., США).

2.1.2 Оборудование

Термостат (BIOSAN, Латвия), центрифуга Minispin (Eppendorf, Германия), центрифуга с охлаждением 5415 (Eppendorf, Германия), CO₂-инкубатор Hera Cell 150 (Heraeus, Германия), счетчик клеток LUNA II™ (Logos, США), многоразовые слайды для

подсчета клеток LUNA Reusable Slides (Logos, США), источник тока для электрофореза (ДНК-технология, Россия), низкотемпературный холодильник (GFL, Германия), шейкер-инкубатор (BIOSAN, Латвия), шейкер (Scientific Industries, США), спектрофотометр NanoVue Plus (GE Healthcare, США), амплификатор IQ™5 BioRad, США), многоканальный спектрофотометр (Biochrom, England), спектрофотометр SmartSpec Plus (BioRad, США), проточный цитофлуориметр FACS Canto II (BD, США), гель-документирующая система Gel Doc XR+ Imager (BioRad, США), мультифункциональный люминометр/флуориметр CLARIOstar (BMG Labtech, Германия), система визуализации ZOE (BioRad, США), спектрофотометр Apollo LB912 (Berthold Technologies, США), клеточный анализатор iCELLigence (ACEA Biosciences, США), источник холодной плазменной струи (ИФП СО РАН, Новосибирск).

2.1.3 Буферы и растворы

ТАЕ: 40 mM Трис, 20 mM уксусная кислота, 1 mM ЭДТА, pH 8,4;

Раствор авертина: 0.2% 2,2,2-трибромэтанол, 0.2% 2-метилбутанол в 0.9% NaCl;

LB-среда - 10 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 5 г/л NaCl;

0,1 M карбонатно-бикарбонатный буфер: 74 mM карбонат натрия, 26 mM бикарбонат натрия, pH 9,5.

2.1.4 Олигонуклеотиды

Синтетические олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН (Новосибирск) с помощью стандартного фосфитамидного метода. Для проведения обратной транскрипции в работе использовали олигонуклеотиды следующей последовательности:

Название праймера	Праймер	Длина продукта, п.н.
HPRT	R: 5'-TATCTTCCACAATCAAGACATT-3' F: 5'-CTCGAGATGTGATGAAGGAG-3'	258
AQP1	R: 5'-GAAGTCGTAGATGAGTACA-3' F: 5'-CCTGGCTATTGACTACAC-3'	145
AQP8	R: 5'-CAGGGTTGAAGTGTCCACCA-3' F: 5'-GTGCCTGTCCGGTCATTGAGA-3'	125

2.1.5 Клеточные культуры

В работе использовали клетки аденокарциномы легкого человека A549 (ФГБУН Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург), аденокарциномы молочной железы человека MCF7 (#ACC 115, DSMZ, Германия), неопухольевые эпителиальные клетки молочной железы MCF10A (Российская коллекция клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск), фибробласты легкого человека Wi-38 (ФГБУН Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург), карциномы кожи человека A431, клетки почки эмбриона человека НЕК 293 (АТСС, США), глиобластомы человека U87MG (АТСС, США), клетки меланомы мыши В16 и клетки рабдомиосаркомы мыши МХ-7 (ФГБУН Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург), а также клетки карциномы толстой кишки мыши СТ26, любезно предоставленные Гурской Н.Г (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова).

2.1.6 Лабораторные животные

В работе использовали 8-12-недельных мышей линий СЗН/Не и Valb/С средней массы 25-30 г развода вивария ИХБФМ СО РАН (Новосибирск). Животных содержали по 5-10 особей в клетке в помещении с режимом освещения 12:12. Мыши имели свободный доступ к пище и воде.

В работе использовали мышей линии SCID Hairless Outbred SHOPrkdcscid HrhMouse Outbred, возраст 6-10 недель, разведения ЦКП «SPF-виварий» Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали в индивидуальных вентилируемых клетках (Animal Care Systems, Colorado, USA) в группах по 1-4 животного со свободным доступом к еде (Ssniff, Soest, Germany) и воде. Животных содержали в специальных чистых помещениях класса С свободных от патогенов при постоянной температуре воздуха $22 \pm 2^\circ\text{C}$ с режимом освещения день/ночь 14/10 часов и относительной влажности $45 \pm 15\%$.

Все эксперименты с лабораторными животными выполнены в соответствии с рекомендациями и требованиями по использованию и уходу за лабораторными животными (ECC Directive 86/609/EEC).

2.2 Методы

2.2.1 Культивирование эукариотических культур клеток

Клетки A549, A431, MCF7, MCF10A, НЕК 293, U87 MG, СТ26, В16 и МХ-7 культивировали в культуральных флаконах для культивирования площадью 25 или 75 см² в средах DMEM (A549, СТ26, В16 и МХ-7), DMEM/F12 (A431, НЕК 293, Wi-38), IMDM (MCF7), Нумес (MCF10A) и MEM (U87MG) в присутствии 2 мМ L-глутамина, 10% FBS,

1х антибиотика-антимикотика (100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата, 0,25 мкг/мл амфотерицина) (далее – полная среда). Условия культивирования: $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$, атмосфера $5,0 \pm 0,5\%$ CO_2 (далее - стандартные условия).

Клетки в состоянии монослоя открепляли от подложки добавлением 20 мкл/см² раствора трипсина (Tryple Express), предварительно промывая добавлением 100 мкл/см² раствора PBS. Открепленные клетки разбавляли соответствующей полной средой в соотношении 1:3 – 1:5 (v:v) для продолжения культивирования.

2.2.2 *Обработка холодной плазменной струей*

Для обработки использовали газоразрядное устройство, разработанное сотрудниками ИФП и ИТПМ СО РАН. Устройство представляет собой кварцевую трубку длиной 100 мм и внутренним диаметром 8 мм, в которую соосно вставлены капилляр длиной 6 мм с внутренним диаметром 2.6 мм и медный электрод длиной 50 мм и диаметром 2 мм. Снаружи кварцевой трубки располагается медный электрод кольцевой формы. Таким образом, разрядная зона представлена внутренним и внешним электродами (Рисунок 10).

В случае прямой обработки ХПС клетки культивировали в 96-луночных планшетах в количестве 2500-10000 клеток на лунку в объеме 200 мкл соответствующей среды. По достижении 70-80% монослоя обрабатывали планшеты холодной плазменной струей при соответствующих каждому эксперименту параметрах. После облучения клетки продолжали культивировать в стандартных условиях.

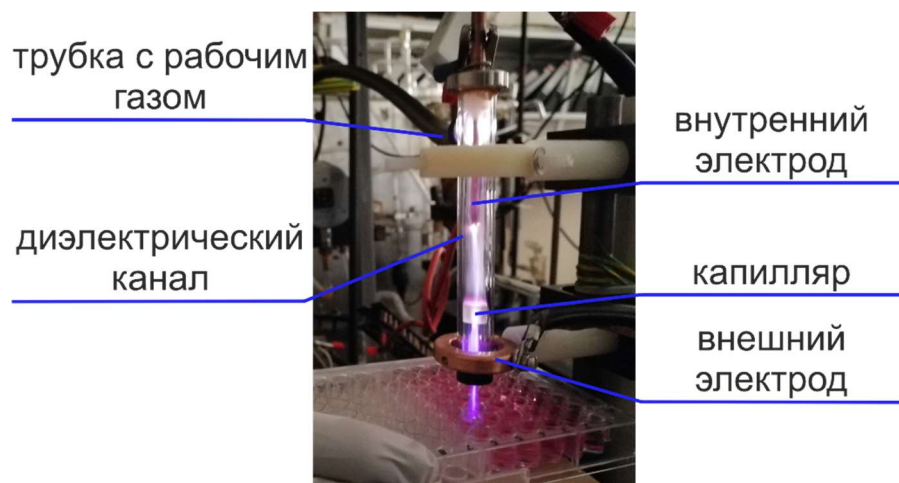


Рисунок 10 - Установка с газоразрядным устройством для обработки клеток ХПС

Для непрямой обработки соответствующую полную среду помещали в лунки 96-луночного или 12-луночного планшета в объеме 100 мкл/лунку и 1400 мкл/лунку соответственно и облучали ХПС. Клетки культивировали отдельно в 96-луночных планшетах в количестве

2500-10000 клеток/лунку в объеме 100 мкл. По достижении около 70% монослоя к клеткам добавляли ХПС-обработанную среду в объеме не более 100 мкл, после чего растили клетки в стандартных условиях.

2.2.3 Анализ цитотоксического действия ХПС (МТТ-тест)

Клетки после обработки культивировали в стандартных условиях в течение 24 ч, после чего заменяли среду на 200 мкл среды RPMI без сыворотки, содержащую МТТ (0,25 мг/мл), и инкубировали 4 ч при 37°C. Далее, среду из лунок удаляли, образовавшиеся в клетках кристаллы формазана растворяли в 150 мкл ДМСО. Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на многоканальном спектрофотометре Apollo LB912 при $\lambda = 570$ нм. Долю живых клеток (в %) рассчитывали, как отношение показателя оптической плотности экспериментального образца к показателю контрольного образца.

2.2.4 Определение жизнеспособности клеток в режиме реального времени на приборе iCELLigence

Клетки A549, MCF7, HEK 293, A431 и MCF10A высаживали на 8ми-луночные планшеты со встроенными микроэлектронными датчиками в полной ростовой среде в объеме 500 мкл и культивировали в стандартных условиях на приборе iCELLigence. Через 24 ч растущие в планшетах клетки облучали струей холодной плазмы, после чего продолжали культивирование в стандартных условиях на приборе iCELLigence. Мониторинг динамики роста клеток в режиме реального времени осуществлялся автоматически со снятием показаний каждые 20 мин. Клеточный индекс (CI) и графики с кривыми роста были сгенерированы при помощи коммерческого программного обеспечения RTCA 1.2 (Roche Diagnosis, Франция).

2.2.5 Визуализация жизнеспособности клеток методом флуоресцентной микроскопии

К облученным клеткам A549, растущим в 96-луночной планшете, добавляли раствор флуоресцентного красителя пропидия йодида (PI) (1,5 мкМ, $E_x = 535$ нм, $E_m = 617$ нм) и инкубировали в течение 30 мин при 37°C, после чего среду отбирали, промывали клетки раствором PBS и добавляли полную культуральную среду. Жизнеспособность клеток анализировали методом флуоресцентной микроскопии с использованием системы визуализации ZOE (BioRad, США).

2.2.6 Анализ изменения концентраций внутриклеточных активных форм кислорода при непрямой обработке ХПС

Для анализа изменения внутриклеточных активных форм кислорода при непрямом воздействии ХПС клетки промывали фосфатным буфером PBS, добавляли к ним раствор индикатора активных форм кислорода и азота диацетатом 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина (H₂DCFDA, 10 мкМ) в PBS и продолжали культивирование в течение 30 мин в стандартных условиях. Далее, клетки промывали PBS и добавляли среду в равных частях облученную ХПС среду DMEM:F12 и необлученную среду, и продолжали культивирование. Через 6 ч - 24 ч после добавления облученной среды, клетки открепляли от пластиковой подложки при помощи реагента Tryple Express и анализировали образцы клеток на проточном цитофлуориметре FACS CantoII. Флуоресценцию детектировали в канале FITC ($\lambda=488$ нм (возбуждение), $\lambda= 535$ нм (эмиссия)). Определяемым параметром было значение MFI (medium fluorescence intensity, средняя интенсивность флуоресценции). Клетки, культивируемые в стандартных условиях, использовали в качестве отрицательного контроля.

2.2.7 Количественное определение концентрации пероксида водорода в культуральной среде флуориметрическим методом

Для анализа изменения внеклеточных активных форм кислорода в результате добавления к клеткам облученной среды, полную среду для культивирования клеток DMEM:F12 обрабатывали ХПС и добавляли к культивируемым клеткам как $\frac{1}{2}$ от финального объема и продолжали культивирование в стандартных условиях. Через 30 мин, 1 ч и 6 ч после добавления облученной среды аликвоты среды отбирали и оценивали количество H₂O₂ в образце флуориметрическим методом с использованием коммерчески доступного набора Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay Kit (Sigma-Aldrich, США) согласно протоколу производителя. Для построения калибровочной кривой использовали растворы H₂O₂ с известной концентрацией, приготовленные методом последовательных разведений в диапазоне 0,04 - 30 мкМ в среде для культивирования клеток. Флуоресценцию детектировали в приборе CLARIOstar (Ex = 540 нм, Em = 590 нм).

2.2.8 Количественное определение концентрации нитритов в культуральной среде методом Грисса

Для анализа изменения внеклеточных активных форм азота в результате добавления к клеткам облученной среды проводили отбор аликвот облученной среды аналогично описанному в предыдущем разделе. Количество нитритов в образцах определяли спектрофотометрическим методом Грисса с использованием коммерчески доступного

набора Griess Reagent System (Promega, США) согласно протоколу производителя. Для построения калибровочной кривой использовали растворы нитрита натрия с известной концентрацией, приготовленные методом последовательных разведений в диапазоне 1,56 - 100 мкМ в среде для культивирования клеток. По данным оптического поглощения образцов ($\lambda=540$ нм) строили калибровочную кривую и определяли концентрацию нитритов в среде.

2.2.9 Выделение суммарной клеточной РНК

Клетки, растущие в лунках 6-луночного культурального планшета, промывали добавлением раствора PBS, лизировали добавлением 1 мл Trizol® и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Лизаты переносили в чистые пробирки, добавляли 200 мкл хлороформа на 1 мл Trizol® и перемешивали встряхиванием в шейкере-инкубаторе при комнатной температуре 2-3 мин, после чего смесь разделяли центрифугированием (13000g, 15 мин, 4°C). Верхнюю водную фазу переносили в чистые пробирки и осаждали РНК путем добавления изопропанола (0.5 мл на 1 мл Trizol®), далее оставляли для формирования осадков на 1 ч при 4°C. Образцы центрифугировали (13000g, 15 мин, 4°C), убирали супернатант, а осадок промывали 1 мл 75% EtOH. Осадок высушивали в термостате при 40°C с открытой крышкой. Высушенный осадок растворяли в 40 мкл деионизованной воды, для определения концентрации РНК оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре NanoVue Plus ($\lambda 260/280$). О степени чистоты РНК судили по величине отношения A260/A280. Приемлемой степенью очистки считали A260/A280 ≥ 1.8 . Сохранность выделенной РНК анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле.

2.2.10 Электрофорез в агарозном геле

К образцам РНК (~500 нг) добавляли 1/5 объема буфера для нанесения РНК. Качество образцов РНК анализировали горизонтальным электрофорезом в 1% агарозном геле в буфере TAE при напряжении электрического поля 20 В/см. По окончании электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали РНК в геле на приборе Gel Doc XR+ Imager.

2.2.11 ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Для обратной транскрипции и амплификации кДНК использовали коммерчески доступную смесь для ОТ-ПЦР в режиме реального времени MasterMix RT SyberGreen. Реакцию ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе IQ™5 в следующих условиях: 45°C – 30 мин, 95°C – 5 мин (обратная транскрипция); денатурация 95°C – 15 с, отжиг – 61°C – 15 с, элонгация – 72°C – 25 с (синтез кДНК, всего 40 циклов). Каждая реакционная смесь содержала 200 пг исследуемой РНК, 30 пмоль каждого праймера

и смесь MasterMix RT SyberGreen. В качестве внутреннего контроля, относительно которого проводилось нормирование продуктов амплификации исследуемого гена, был использован ген «домашнего хозяйства» глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы – GAPDH.

Порог детекции (Ct) для каждой реакции определялся автоматически программой для анализа результатов iQ5 software (BioRad, США). Данные были нормализованы согласно модели $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, где $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{целевого гена}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{ХПС}} - (Ct_{\text{целевого гена}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{контроль}}$, где ХПС – это клетки, облученные ХПС, контроль – необлученные клетки [154].

2.2.12 Анализ жизнеспособности клеток в системе аннексин V-йодид пропидия

Клетки высаживали в 96-луночные планшеты в концентрации 10 тыс. клеток/лунку. По достижении 70 % монослоя обрабатывали ХПС в течение 1 мин. Через 24 ч после облучения производили окраску клеток аннексином V и пропидия йодидом (PI) с использованием набора BD Pharmingen Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, США) в соответствии с протоколом производителя. Последующий анализ проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACS Canto II (BD, США). Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (BD Biosciences, США).

2.2.13 Анализ фагоцитарной активности клеток

К клеткам ТНР-1, растущим в среде RPMI-1640 в 6-луночной планшете (5×10⁵ клеток/лунку) для индукции дифференцировки в М1-макрофагальный фенотип добавляли 50 нМ РМА и продолжали культивирование в течение 48 ч. По окончании инкубирования клетки ТНР-1 окрашивали добавлением Cell Tracker Green (1 мкМ) с последующей инкубацией при 37 °С течение 30 мин, после среду удаляли, клетки дважды промывали добавлением 1 мл PBS. Аналогично, предварительно окрашивали сфероиды MCF7-EGFR раствором Cell Tracker Red (10 мкМ), и облучали ХПС/СО-ХПС. К окрашенным культивируемым ТНР-1 добавляли облученные окрашенные сфероиды MCF7-EGFR и продолжали совместное культивирование в течение 2 ч в стандартных условиях. Клетки в лунках анализировали с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа.

2.2.14 Анализ жизнеспособности клеток сфероидов методом проточной цитометрии

Сфероиды MCF7-EGFR культивировали в лунках 96-луночного планшета в объеме 100 мкл культуральной среды, облучали ХПС, после чего добавляли 100 мкл свежей среды

и продолжали культивирование. В случае обработки СО-ХПС, к сфероидам добавляли 100 мкл облученной среды, продолжали культивирование в стандартных условиях. По окончании культивирования сфероиды разрушали добавлением раствора StemPro™ Accutase, открепленные клетки окрашивали раствором йодида пропидия в соответствии с протоколом производителя, и анализировали на проточном цитометре, накапливая не менее 1×10^5 событий. Определяемым параметром было значение MFI (Mean Fluorescence Intensity, средняя интенсивность флуоресценции).

2.2.15 Трансплантация опухолевых клеток мышам и облучение ХПС

Мышам линии SCID перевивали опухолевые клетки U87MG в количестве 6×10^6 клеток/мышь подкожно в объеме 100 мкл в PBS с матригелем (PBS:матригель 1:1). Размер опухолей измеряли штангенциркулем 2 раза в неделю. Объем опухоли определяли по формуле: $V = 0.4 \times L \times W^2$, где L - наибольший диаметр опухоли, мм, W – наименьший диаметр опухоли, мм.

По достижении опухолей среднего размера 100 мм^3 , опухолевые узлы облучали ХПС. Для этого перед облучением ХПС мышей анестезировали инъекциями раствора авертина (400 мкл/мышь) внутрибрюшинно, после чего животные погружались в сон через 5 минут. Обездвиженное животное помещали на предметный столик и направляли струю холодной плазмы непосредственно на зону опухолевого узла или аналогичную зону без опухоли у контрольных животных. Температуру струи контролировали тепловизором Testo 872 (Testo AG, Германия). В ходе исследования анализировали торможение роста опухоли (ТРО) – параметр, который рассчитывается по следующей формуле: $\text{ТРО} = (\Delta C - \Delta T) \times 100 / \Delta C$, где ΔC – среднее изменение размера опухоли в контрольной группе, без облучения, ΔT – среднее изменения размера опухоли в экспериментальной группе. Изменение размеров опухолей рассчитывалось по разнице среднего размера опухоли в день начала лечения и в финальный день эксперимента.

2.2.16 Статистический анализ данных

Для статического сравнения данных между двумя группами, полученных в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, использовали параметрический t-критерий Стьюдента и непараметрический критерий хи-квадрат Пирсона. При $p \leq 0.05$ различия между группами считали достоверными. Кривые выживаемости Каплана-Майера и статистику Log-Rank рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.1 (Сан-Диего, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Параметры, влияющие на цитотоксический эффект холодной плазменной струи

Основные эффекты холодной плазменной струи при облучении биоматериала обусловлены активными формами азота и кислорода, генерируемыми в плазменной струе. В случае воздействия ХПС на культивируемые клетки, на эффективность цитотоксических эффектов облучения может влиять как химический состав этих форм, так и эффективность доставки их в клетку. В свою очередь репертуар активных форм кислорода и азота может зависеть от различных физических параметров: состава газа, влажности воздуха, напряжения, наличия заземленной подложки и др., а на эффективность доставки может оказывать влияние тип воздействия (прямое или не прямое), продолжительность облучения, расстояние от источника частиц до облучаемого объекта, тип клеток и их количество (Рисунок 11). Для перехода к подбору параметров, в которых возможна селективность струи по отношению к раковым клеткам, важно определить изменение каких параметров изменяет цитотоксический эффект ХПС, а какие из них не влияют на него.

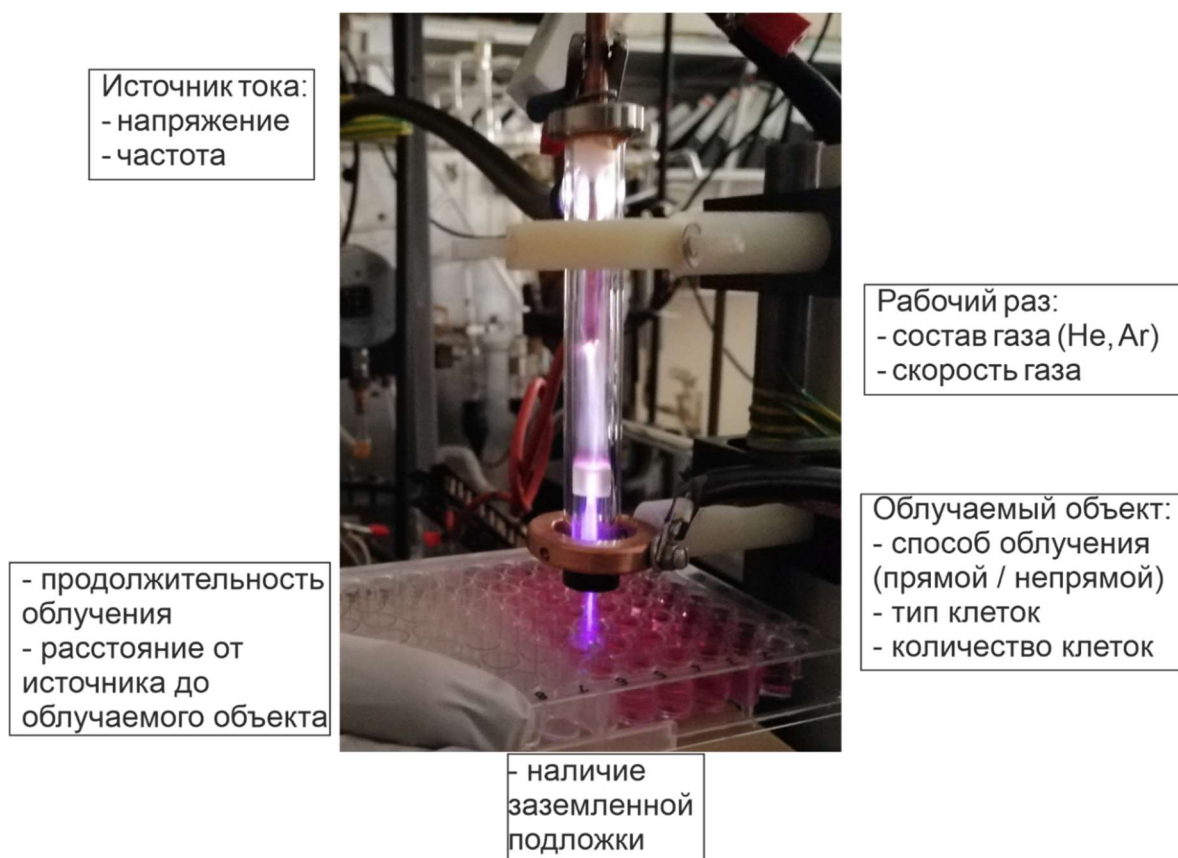


Рисунок 11. Установка с газоразрядным устройством для облучения растущих клеток. Указаны параметры, потенциально способные влиять на цитотоксический эффект холодной плазменной струи

3.1.1 Продолжительность облучения

Дозозависимость – одна из ключевых характеристик, подтверждающих биологический эффект агента. В случае облучения ХПС доза определяется временем облучения при условии отсутствия изменения в других параметрах. Влияние струи холодной плазмы на выживаемость опухолевых клеток изучали на модели клеток аденокарциномы легкого человека А549. Клетки облучали в течение 5-120 секунд, после чего продолжали культивирование в стандартных условиях. Через 24 ч методом МТТ определяли жизнеспособность облученных клеток. Было показано, что жизнеспособность клеток снижается по мере увеличения времени обработки от 30 с до 120 с. Кратковременная (до 30 с) обработка клеток струей холодной плазмы при указанных параметрах облучения практически не влияла на выживаемость клеток (Рисунок 12).

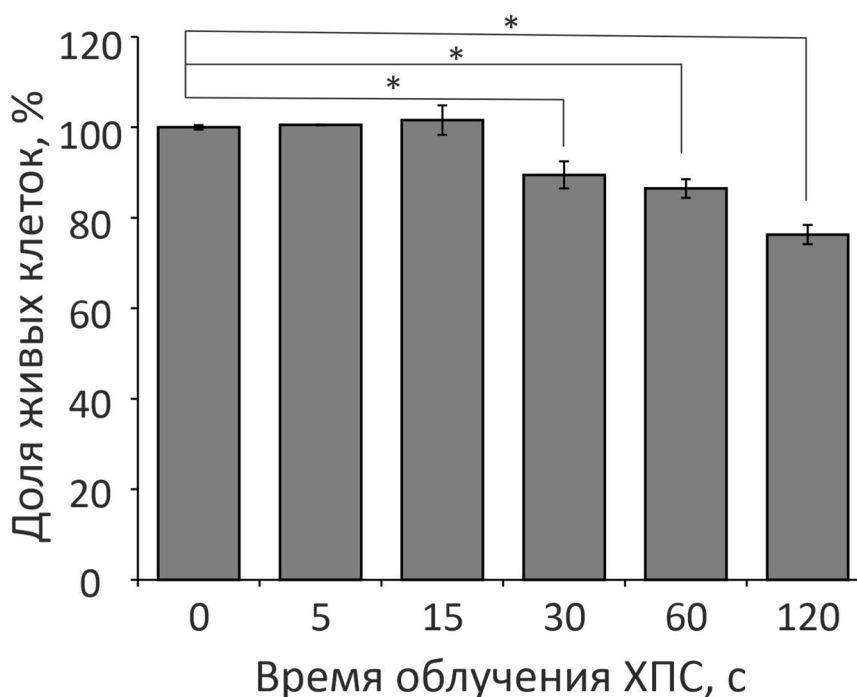


Рисунок 12 - Влияние холодной плазменной струи на жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого А549. Жизнеспособность контрольных (необработанных) клеток принята за 100%. Параметры генератора ХПС: 4,2 кВ В, газ – гелий 9 л/мин. Данные МТТ-анализа представлены как среднее значение трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение, * $p < 0.05$.

Параллельно для визуализации гибели клеток использовали низкомолекулярный флуоресцентный краситель йодид пропидия, который интеркалирует в ДНК гибнущих клеток с поврежденной мембраной, при этом не проникает в живые клетки (Рисунок 13).

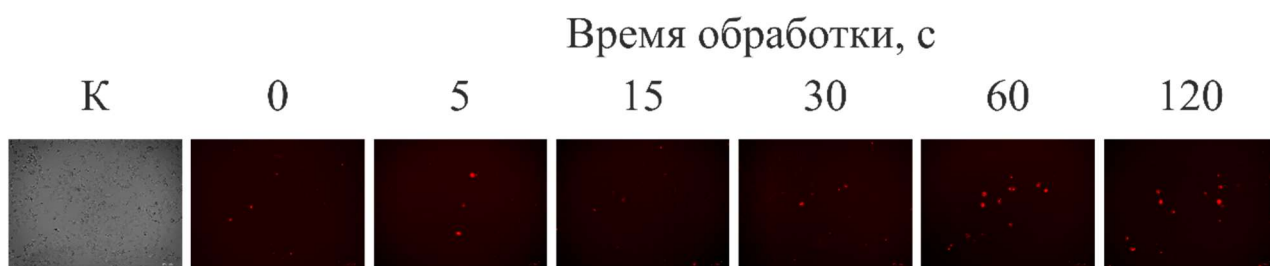


Рисунок 13 - Флуоресцентная микроскопия клеток аденокарциномы легкого A549, окрашенных йодидом пропидия через 24 часа после обработки ХПС в гелии. К – необлученные клетки в проходящем свете. Представлены характерные изображения.

Было обнаружено, что доля окрашенных клеток возрастала с увеличением времени обработки струей холодной плазмы. Таким образом показано, что обработка ХПС индуцирует дозозависимую гибель клеток.

3.1.2 Способ облучения

При облучении ХПС различают прямую, когда струя касается клеток, и непрямую обработку, когда к клеткам добавляют предварительно облученную ХПС культуральную среду или буферный раствор (Рисунок 14). При непрямой обработке исключаются физические эффекты воздействия ХПС на клетки, такие как электрическое поле и УФ облучение.

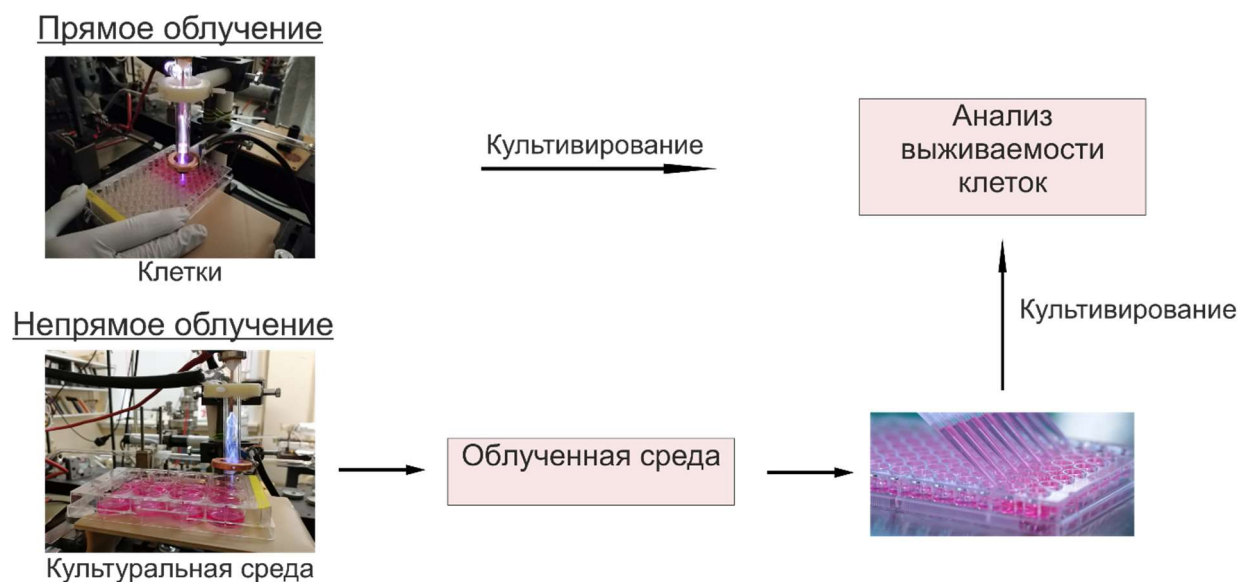


Рисунок 14 - Способы облучения клеток ХПС

Для сравнения прямого и опосредованного облучения в качестве модели использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF7. В экспериментах, для опосредованной обработки полную культуральную среду IMDM помещали в лунки 12-

луночного культурального планшета и облучали 5 - 45 с (на 100 мкл среды) ХПС со следующими параметрами: U=4,9 кВ, струя в аргоне со скоростью подачи газа 4 л/мин. Затем к клеткам, культивируемым в 96-луночном планшете, находящимся в состоянии конфлюэнтности около 50 %, добавляли равный объем культуральной среды, облученной ХПС, и продолжали культивирование. Через 24 часа оценивали жизнеспособность клеток методом МТТ. В случае прямой обработки, клетки, культивируемым в 96-луночном планшете, находящимся в состоянии конфлюэнтности около 50 %, облучали при аналогичных параметрах облучения и оценивали изменения жизнеспособности через 24 ч после облучения методом МТТ.

Из данных, представленных на рисунке 15, видно, что как в случае прямой, так и непрямой обработки, цитотоксический эффект пропорционален времени облучения. Значимой разницы между прямой и опосредованной обработкой при используемых параметрах облучения обнаружено не было.

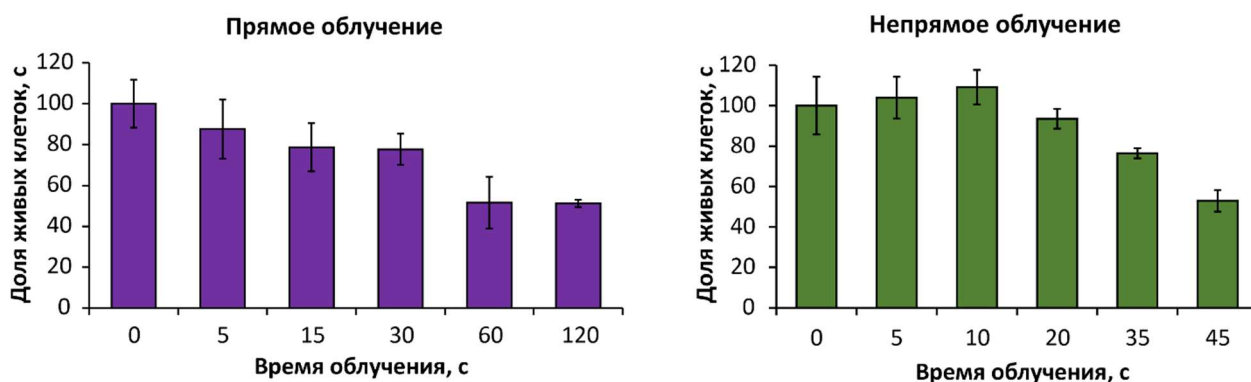


Рисунок 15 - Влияние прямой и непрямой обработки холодной плазмой на жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы MCF7. Параметры генератора ХПС: 4,9 кВ, газ – аргон 4 л/мин. Данные МТТ-теста, проведенного через 24 часа после воздействия. Результаты представлены как среднее значение доли живых клеток в трех независимых экспериментах \pm SD.

Поскольку в случае опосредованного воздействия исключаются физические компоненты воздействия, можно сделать вывод, что вклад физических факторов в цитотоксический эффект ХПС незначителен и в дальнейшем можно использовать как прямую, так и опосредованную обработку в зависимости от дизайна эксперимента, а также транслировать закономерности, полученные при одном способе, на другой.

3.1.3 Рабочий раз

Состав рабочего газа оказывает влияние на концентрации веществ, формирующихся в ХПС, и, соответственно, на оказываемые струей цитотоксические эффекты. Для

сравнения использовали два инертных газа - гелий и аргон, значительно отличающихся по ряду параметров. Масса атомов аргона в 10 раз больше массы атомов гелия, а пороговые энергии ионизации и возбуждения у аргона ниже, что сказывается на физических свойствах самой плазменной струи (концентрация электронов, величина электрического поля и т.д.) и на плазмохимии у поверхности. Влияние состава рабочего газа на выживаемость опухолевых клеток изучали на клеточной модели аденокарциномы легкого человека A549. Клетки облучали струей в аргоне или в гелии при идентичных остальных параметрах. Анализ жизнеспособности облученных клеток методом МТТ показал гомологичное снижение жизнеспособности при использовании как гелия, так и аргона, при соответствующих временах облучения (Рисунок 16). Максимальное снижение жизнеспособности клеток достигалось при обработке в течение 2 мин при использовании как гелия, так и аргона.

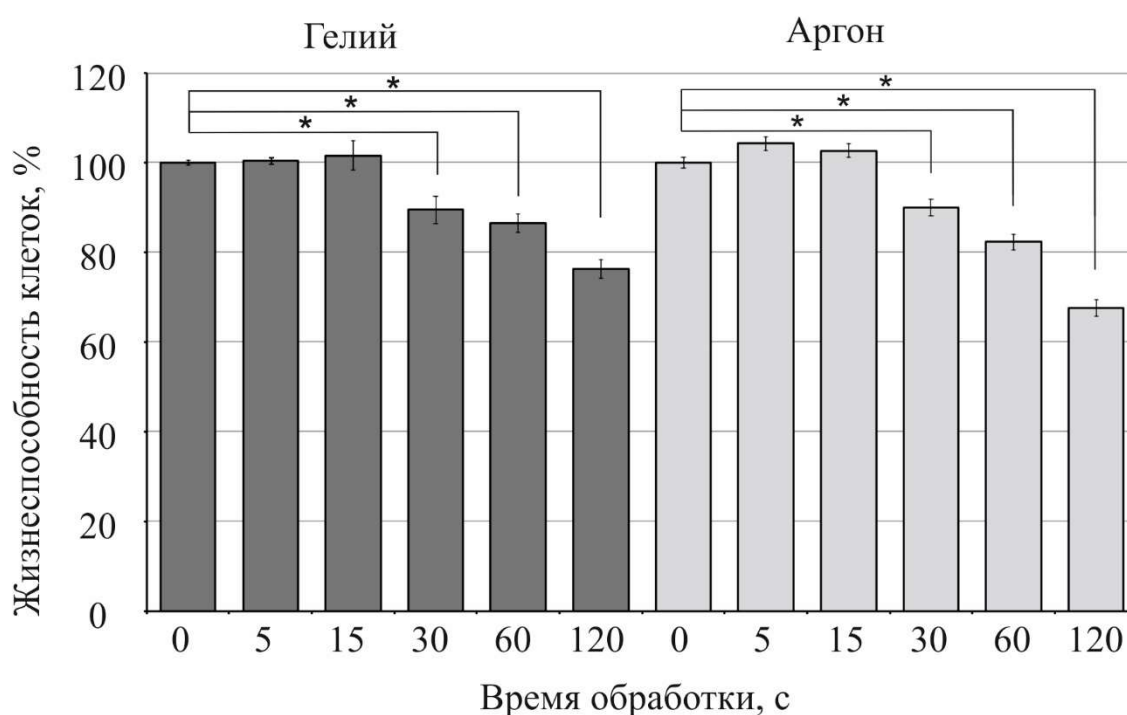


Рисунок 16 - Влияние холодной плазменной струи на жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого A549. Жизнеспособность контрольных (необработанных) клеток принята за 100%. Данные МТТ-анализа представлены как среднее значение трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение, * $p < 0.05$

Таким образом, можно сделать вывод, что в дальнейших экспериментах можно использовать как гелий, так и аргон.

3.1.4 Скорость газа

При исследовании влияния скорости потока газа на эффекты, оказываемые струей на клетки-мишени особое внимание уделялось измерениям линии ОН, как наиболее активного радикала, образующего пероксид, взаимодействующий с клетками. Исследование динамики спектров показало следующее: интенсивность линий ОН при скорости потока гелия $v=3-4$ л/мин максимальна и резко уменьшается при дальнейшем увеличении скорости потока (Рисунок 17).

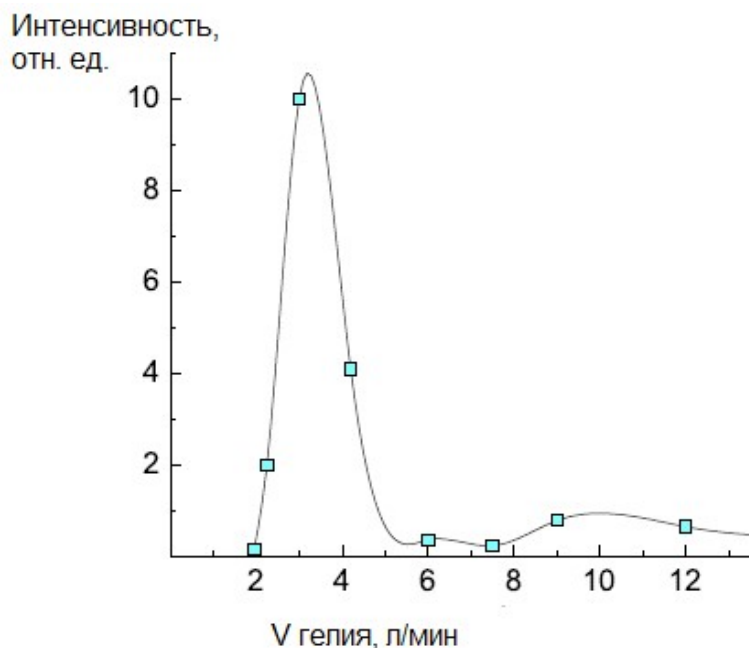


Рисунок 17 - Изменение интенсивности линий ОН ($\lambda=309$ нм) от скорости потока гелия (V); U = 4.9 кВ. Данные получены д.ф.-м. наук Закревским Д. Э.

Для оценки влияния скорости газа на жизнеспособность ХПС, клетки аденокарциномы легкого человека А549 высаживали на планшеты анализатора iCELLigence. Клетки обрабатывали ХПС в гелии в течение 2 мин со скоростями газа 4 л/мин и 6 л/мин. Пролиферацию клеток оценивали в режиме реального времени (Рисунок 18). Клеточный анализатор iCELLigence позволяет в реальном времени анализировать пролиферацию клеток, изменение жизнеспособности при цитотоксическом воздействии стимулов или агентов. Принцип работы прибора основан на измерении с помощью микроэлектронных биосенсоров электрического сопротивления в индивидуальных лунках планшета, которое пропорционально площади соприкосновения клеток с дном планшета. Электрическое сопротивление в отсутствие клеток определяется, в основном, ионным составом среды на границе раствор/электрод. Клетки, прикрепляясь к поверхности лунки, действуют как изолятор и увеличивают сопротивление. Детекция сопротивления каждые

20 мин позволяет получать данные в режиме реального времени и выстраивать кривые пролиферации. Клеточный индекс – относительная величина, основанная на измерении сопротивления в лунках и отражающая жизнеспособность клеток.

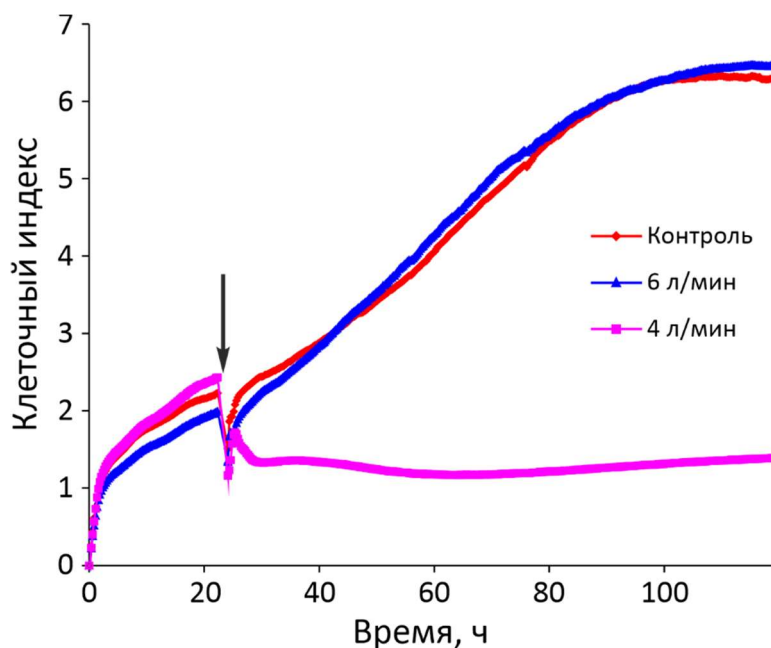


Рисунок 18 - Влияние скорости рабочего газа на пролиферацию клеток аденокарциномы легкого человека A549. Параметры генератора ХПС: 4,9 кВ, с использованием заземленной подложки, газ – гелий 4 л/мин и 6 л/мин. Время облучения – 2 мин. Представлены характерные данные прибора iCELLigence. Стрелкой обозначен момент облучения ХПС

Было показано, что при оптимальной скорости подачи газа 4 л/мин ХПС значительно снижает пролиферацию клеток аденокарциномы легкого A549 в отличие от ХПС со скоростью газа 6 л/мин (Рисунок 18).

Таким образом, скорость подачи рабочего газа оказывает влияние на цитотоксический эффект облучения ХПС.

3.1.5 Напряжение

Величина напряжения на нагруженном электроде при использовании плазменной струи является одним из основных параметров, который определяет динамику струи и её характер взаимодействия с поверхностью. От приложенного напряжения зависит энергия электронов в плазменной струе, скорость процессов ионизации, диссоциации и возбуждения молекул, вызванных электронным ударом, что влияет на индуцируемые плазмохимические процессы, и, как следствие, на оказываемый биологический эффект плазменной струи.

Нежелательным токсическим эффектом при воздействии ХПС на клетки может стать температура струи выше 38°C, которая зависит как от скорости потока газа, так и от напряжения. Поэтому, для выбора диапазона параметра напряжения для исследования эффектов ХПС на клетки предварительно оценивали изменение температуры струи при изменении скорости потока газа и напряжения. На рисунке 19 представлены данные о функциональной зависимости температуры струи от скорости потока газа и напряжения. Можно видеть, что увеличение напряжения свыше 5 кВ ведет к критическому увеличению температуры струи при всех исследуемых скоростях газа (1.5-13 л/мин).

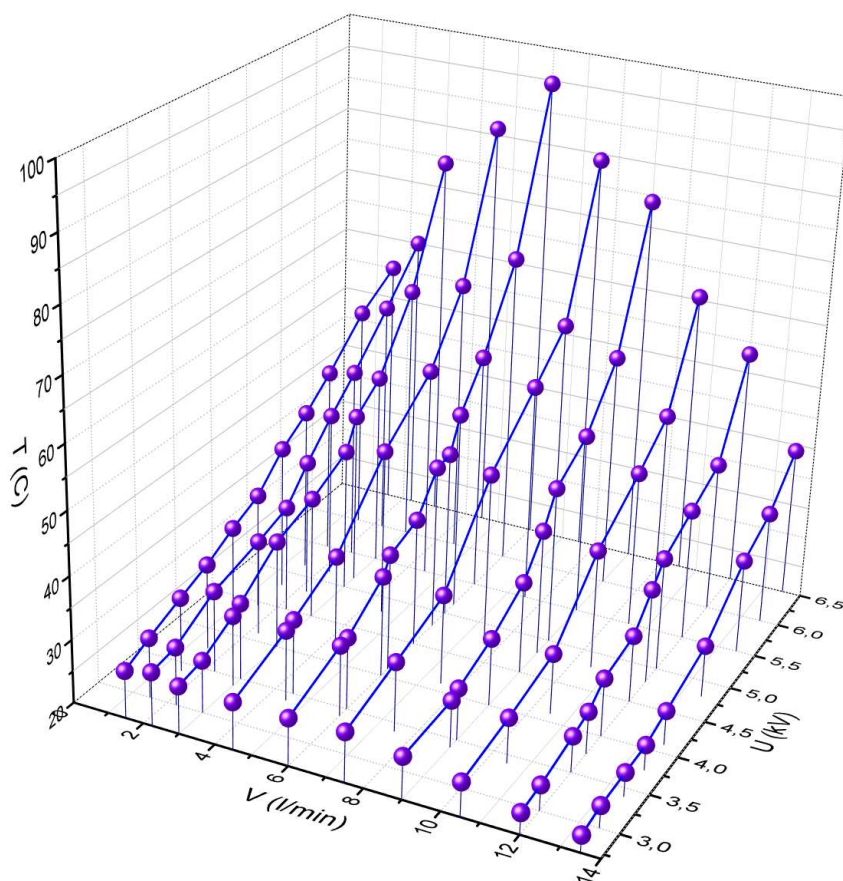


Рисунок 19 - Трехмерная карта функциональной зависимости параметров температуры от скорости потока гелия и напряжения плазменной струи. Частота 13 кГц. Данные получены д.ф.-м. наук Закревским Д.Э.

Для анализа влияния напряжения, подаваемого на нагруженный электрод в плазменном устройстве, генерирующем ХПС на цитотоксическую активность в отношении клеток А549, проводили прямое облучение при различных амплитудах переменного напряжения. Экспериментально обнаружено, что изменение амплитуды напряжения струи в аргоне в диапазоне 3.8-5.6 кВ не привело к изменению эффективности гибели клеток

(Рисунок 20). Дополнительные исследования воздействия на клетки потока инертного газа без плазменной струи и при нулевом напряжении показали, что “обдув” клеток потоком аргона не оказывал влияние на жизнеспособность клеток.

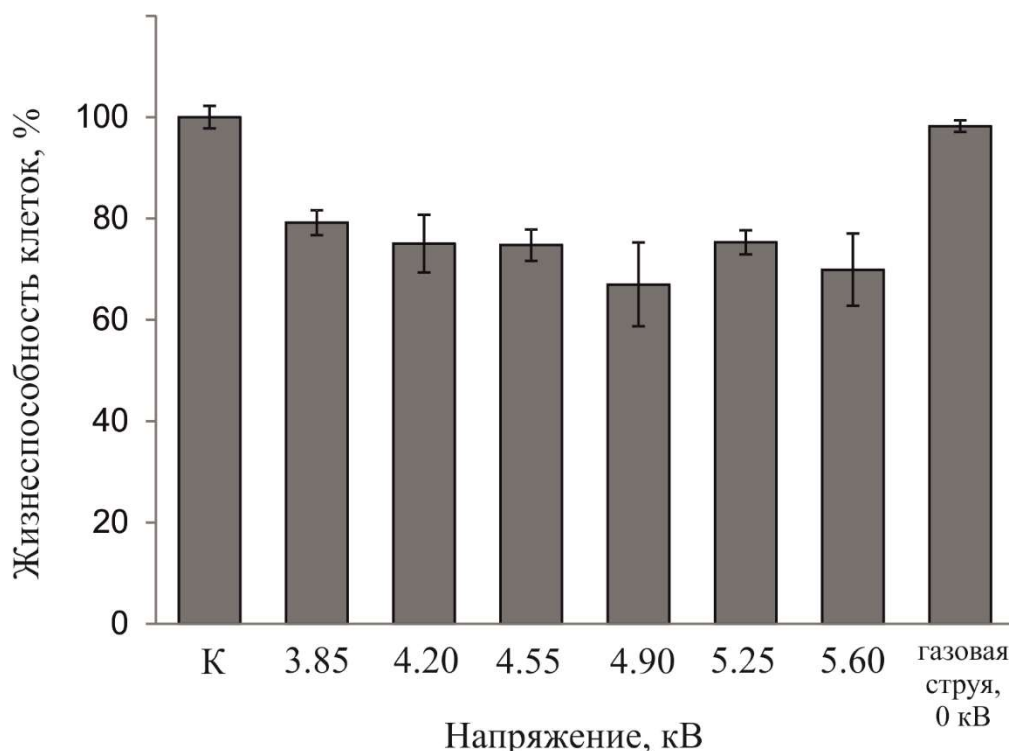


Рисунок 20 - Влияние напряжения ХПС на цитотоксическую активность в отношении клеток А549. Параметры генератора ХПС: газ – аргон 4 л/мин. Продолжительность облучения - 1 мин. Данные МТТ анализа, проведенного через 48 ч после облучения. Данные представлены как среднее значение трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение

3.1.6 Использование заземленной подложки

Для интенсификации генерации радикала ОН при взаимодействии плазменной струи с биологическими объектами было предложено усилить электрическое поле в зоне контакта, в частности помещением заземленного электрода (или “заземленной подложки” для разделения его с кольцевым заземленным электродом в системе) под объектом. Расчеты показали, что использование заземленной подложки приводит к изменению распределения электрического поля над биологическим объектом, а в результате ряда плазмохимических реакций значительно увеличивается концентрация ОН-радикалов над поверхностью жидкости (Рисунок 21). Можно видеть, что, приближаясь к поверхности мишени, стример начинает ускоряться и скорость ионизации возрастает: скорость ионизации без подложки была в 4 раза меньше, чем с подложкой.

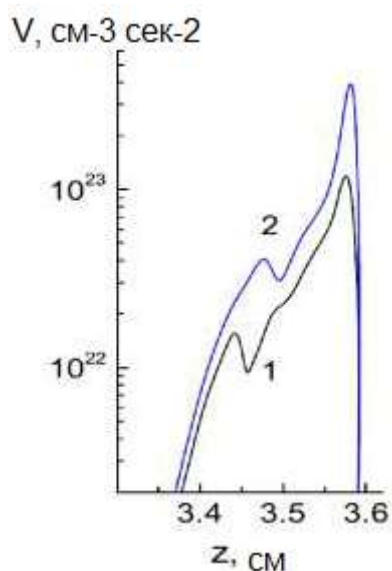


Рисунок 21 - Профиль скорости ионизации плазмы в единице объема (V) для облучения с заземленной подложкой и без нее в зависимости от расстояния (Z) от сопла до мишени. Данные двухмерного гидродинамического моделирования в цилиндрической постановке. Профиль для случаев без заземленной подложки (1) и с заземленной подложкой (2). Параметры облучения: V гелия 3 л/мин, U=4.9 кВ. Данные получены д.ф.-м. наук Швейгерт И.В.

Для проверки гипотезы усиления цитотоксического эффекта при использовании дополнительного заземленного электрода анализировали эффекты струи в гелии в отношении клеток A549. Цитотоксический эффект облучения оценивали в режиме реального времени на приборе iCELLigence. Клетки аденокарциномы легкого человека A549 высаживали на планшеты анализатора iCELLigence и облучали струей в гелии в течение 2 мин с использованием заземленной подложки и без нее. Пролиферацию клеток оценивали в режиме реального времени (Рисунок 22).

Можно видеть, что использование заземленного электрода усиливает цитотоксическое действие ХПС (Рисунок 22).

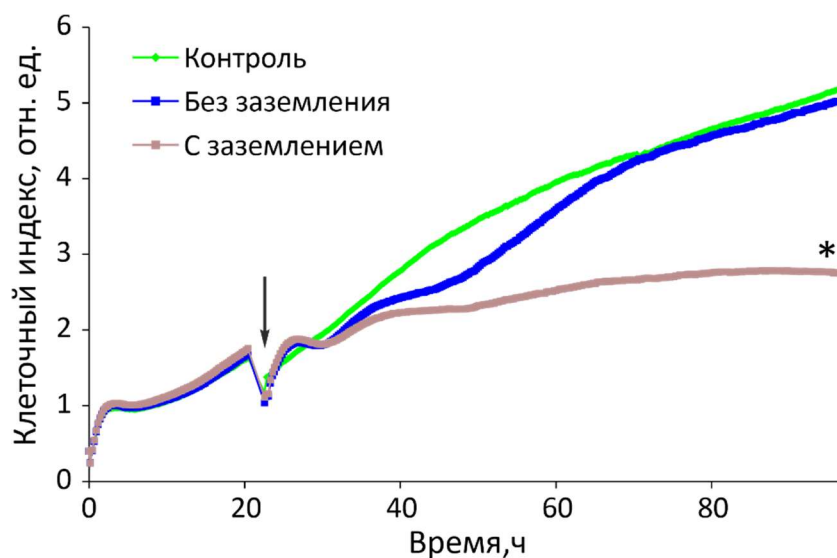


Рисунок 22 - Цитотоксическое действие ХПС в отношении клеток A549 при использовании заземленной подложки и без нее. Данные пролиферации клеток в режиме реального времени. Стрелкой указан момент облучения. Параметры генератора ХПС: 4,2 кВ, гелий 5 л/мин. Время облучения – 2 мин. (*) – $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

Для подтверждения эффективности использования заземленной подложки проводили облучение клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF7, и анализировали цитотоксические эффекты используя метод МТТ-анализа. Для этого клетки в 96-луночном планшете обрабатывали ХПС в течение 5 - 120 секунд с использованием подложки и без нее. Жизнеспособность оценивали через 24 ч (Рисунок 23).

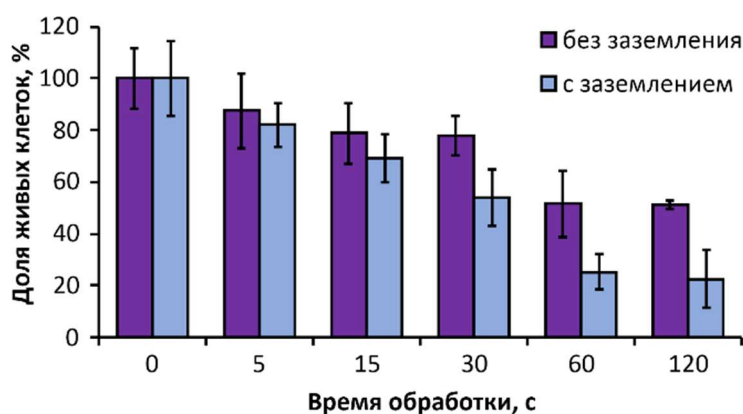


Рисунок 23 - Влияние обработки холодной плазмой на жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы MCF7 при обработке с использованием заземленной подложки и без неё. Параметры генератора ХПС: 4,9 кВ, газ – аргон 4 л/мин. Данные МТТ-теста, проведенного через 24 часа после воздействия. Результаты представлены как среднее значение доли живых клеток в трех независимых экспериментах \pm SD.

Из данных, представленных на рисунке 23, можно видеть, что цитотоксический эффект ХПС увеличивается с увеличением времени облучения, как в случае использования заземленной подложки, так и без нее. При длительности обработки 60-120 с наблюдается статистически значимое увеличение цитотоксического эффекта от облучения с заземлением по сравнению с облучением без него.

Таким образом показано, что заземленная подложка позволяет усилить цитотоксический эффект по отношению к опухолевым клеткам.

3.1.7 Частота

Физические и химические процессы вблизи мишени зависят от частоты контактов плазмы с мишенью, поэтому было важно изучить влияние разных частот облучения на жизнеспособность клеток.

Результаты по изменению жизнеспособности клеток A549 представлены на рис. 24. Можно видеть, что изменение напряжения в исследуемом диапазоне при $fU = 13$ кГц не влияет на цитотоксическое действие плазменной струи. Во всех образцах наблюдалось снижение жизнеспособности клеток в среднем на 30% (рис. 24а). В случае $fU = 22$ кГц наблюдалось более существенное снижение жизнеспособности клеток после облучения в сравнении с контрольными необлученными клетками. При $U = 4,9$ кВ жизнеспособными оставались лишь 40% клеток (рис. 24б). Таким образом, струя, формируемая при $fU = 22$ кГц оказывает больший цитотоксический эффект, чем струя, формируемая при $fU = 13$ кГц.

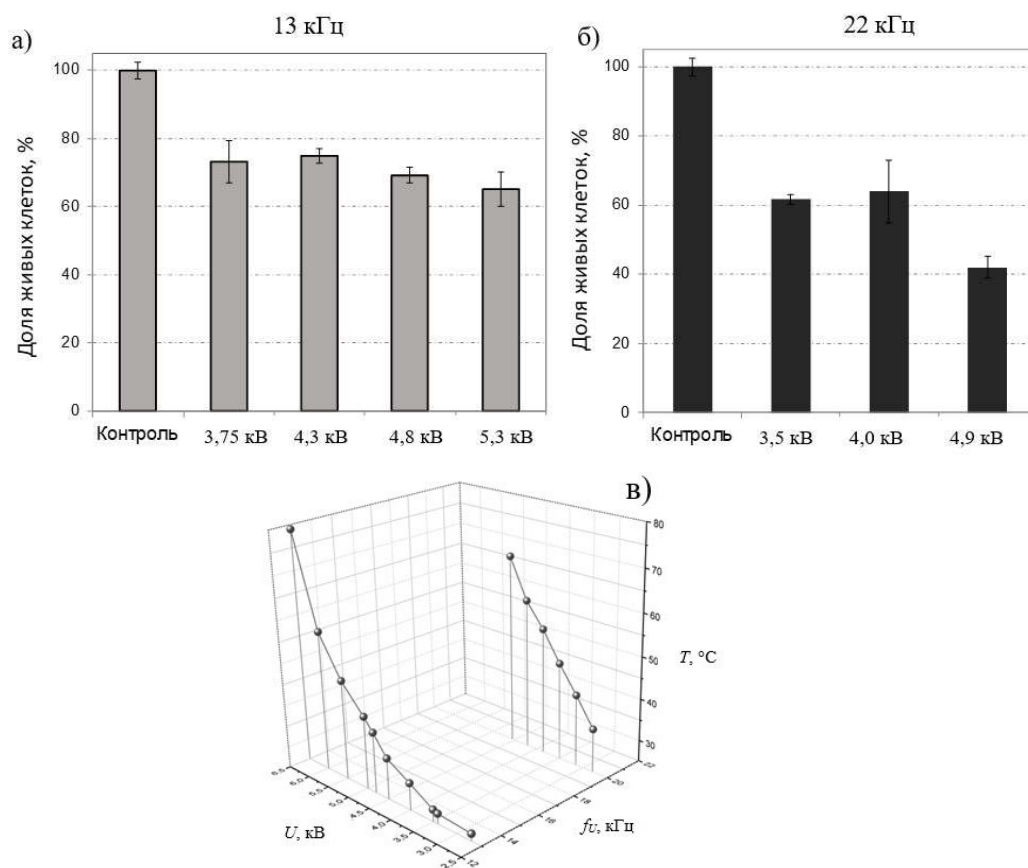


Рис. 24. Изменение жизнеспособности клеток A549 при прямом воздействии холодной плазменной струи при: а) $fU = 13$ кГц; $v = 9$ л/мин б) $fU = 22$ кГц; $v = 9$ л/мин (перерисовать или оригинал). в) Температура мишени в зависимости от v и U

Снижение жизнеспособности клеток может происходить не только в результате плазмохимического воздействия струи, но и в результате повышения температуры в зоне контакта струи с мишенью. Из результатов рис. Хв можно заключить, что облучение клеток при $fU = 22$ кГц и $U > 3,25$ кВ вызывает чрезмерный нагрев клеток, что может вести к снижению их жизнеспособности.

Поскольку предлагаемый подход нацелен на разработку протоколов терапевтического воздействия на опухолевые образования у пациентов, использование частоты ~ 13 кГц и напряжения до 5 кВ являются более предпочтительными параметрами, не ведущими к термическим повреждениям облучаемой области. Усиление цитотоксического воздействия может осуществляться при варьировании других параметров струи и типа облучения: – изменение формы иницирующего напряжения (импульсы с регулируемой длительностью); – изменение частоты касания плазменного образования биологического объекта (управление эффектом саморегуляции стримерного пробоя) (10.21883/TPL.2022.14.55124.18977); – увеличение времени воздействия на объект;

– введение в систему про- или антиоксидантов, – комбинирование с различными ингибиторами клеточных процессов и др.

3.1.8 Расстояние от сопла до облучаемого объекта

Распределение активных частиц в потоке ХПС неоднородно, что подтверждено расчетами (Рисунок 21), поэтому расстояние от сопла до облучаемого объекта может быть одной из характеристик, которые следует контролировать и подбирать при облучении. Для анализа влияния расстояние от сопла до облучаемого объекта на облучение, клетки аденокарциномы легкого человека A549 в 96-луночном планшете обрабатывали ХПС в течение 30 с, 60 с и 120 с. Сравнивали 3 расстояния: 25 мм, минимально допустимое расстояние из-за высоты культурального планшета, 35 мм, когда видимый луч плазмы касается культуральной среды с клетками, и 45 мм. Жизнеспособность оценивали через 24 ч методом МТТ-анализа (Рисунок 25).

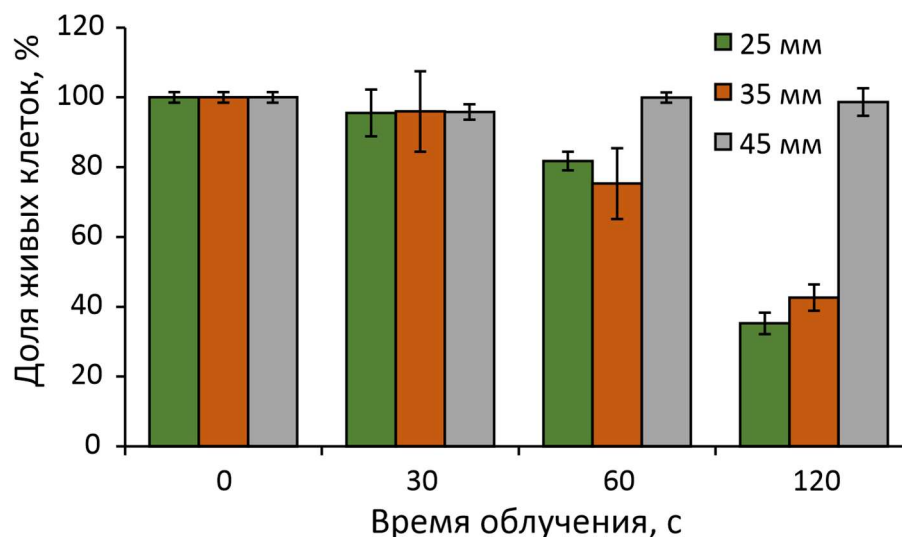


Рисунок 24 - Влияние прямой обработки холодной плазмой на жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого человека A549 при обработке с разным расстоянием от сопла до клеток. Параметры генератора ХПС: 4,5 кВ, 23 кГц, гелий 9 л/мин. Данные МТТ-теста, проведенного через 24 часа после воздействия. Результаты представлены как среднее значение доли живых клеток в трех независимых экспериментах \pm стандартное отклонение.

На рисунке 25 можно видеть, что цитотоксический эффект ХПС увеличивается с увеличением времени облучения в случае расстояний 25 и 35 мм. При этом статистически значимой разницы между эффективностью цитотоксических эффектов облучения на этих расстояниях не наблюдается. При облучении на расстоянии 45 мм цитотоксический эффект отсутствует при используемых длительностях облучения ХПС.

Таким образом, постановка биообъекта на таком расстоянии от струи, при котором видимый луч ХПС достигает клеток, позволяет достигать цитотоксических эффектов. На больших расстояниях, по-видимому, активные частицы не достигают клеток, что приводит к отсутствию цитотоксического эффекта.

3.1.9 Тип клеток

Клеточные линии отличаются своими биологическими характеристиками, в том числе и антиоксидантной активностью. Для перехода к противоопухолевой терапии важно подбирать такие условия облучения, в которых ХПС оказывает цитотоксический эффект на раковые клетки и не оказывает или оказывает в меньшей мере на здоровые клетки. Чтобы понять целесообразность таких исследований, важно посмотреть зависит ли цитотоксический эффект от типа клеток.

В качестве клеточных моделей использовали раковые клетки мыши различного гистологического происхождения: карциномы толстой кишки СТ26, меланомы В16 и рабдомиосаркомы МХ-7. В эксперименте клетки в 96-луночном планшете обрабатывали ХПС в течение 5-120 с со следующими параметрами: струя в гелии, напряжение 4,9 кВ, скорость газа – 3 л/мин. Жизнеспособность оценивали через 24 часа в МТТ-тесте (Рисунок 26).

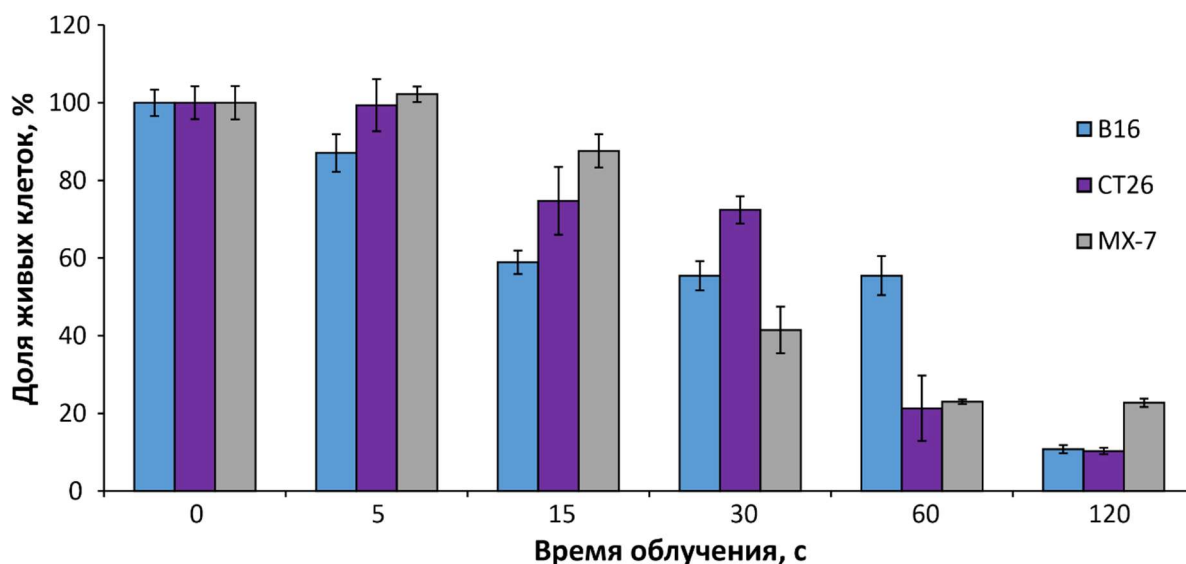


Рисунок 25 - Влияние прямого облучения ХПС на жизнеспособность клеток В16, СТ26 и МХ-7. Параметры генератора ХПС: 4,9 кВ, гелий 3 л/мин. Данные МТТ-теста, проведенного через 24 часа после воздействия. Результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение.

На рисунке 26 можно видеть, что для всех клеточных линий прямая обработка ХПС приводит к снижению жизнеспособности при увеличении времени обработки. При этом клетки линии МХ-7 были наиболее чувствительными к действию ХПС в использованных условиях обработки, что видно по снижению доли живых клеток до 50 % после 30 с обработки. Клетки меланомы мыши В16, наоборот были наиболее резистентными к облучению.

Можно сделать вывод, что цитотоксический эффект ХПС зависит от типа клеток.

3.1.10 Количество клеток

В работы были использованы адгезионные клеточные культуры, которые в лабораторных условиях растут прикрепленными к пластиковой подложке. Поскольку считается, что цитотоксическое действие ХПС происходит в результате воздействия активных форм кислорода и азота, можно предположить, что доза АФА и АФК, получаемая клетками при облучении, зависит от количества этих клеток в облучаемом объеме. Для того, чтобы оценить влияние количества клеток на цитотоксический эффект ХПС клетки рабдомиосаркомы мыши МХ-7 высаживали в 96-луночный планшет в количестве от $2,5 \times 10^3$ до 3×10^4 клеток на лунку. Через 24 часа клетки облучали ХПС в течение 1 мин при следующих параметрах: 3 кВ, гелий 3 л/мин, 13 кГц. Жизнеспособность оценивали через 24 часа в МТТ-тесте (Рисунок 27).

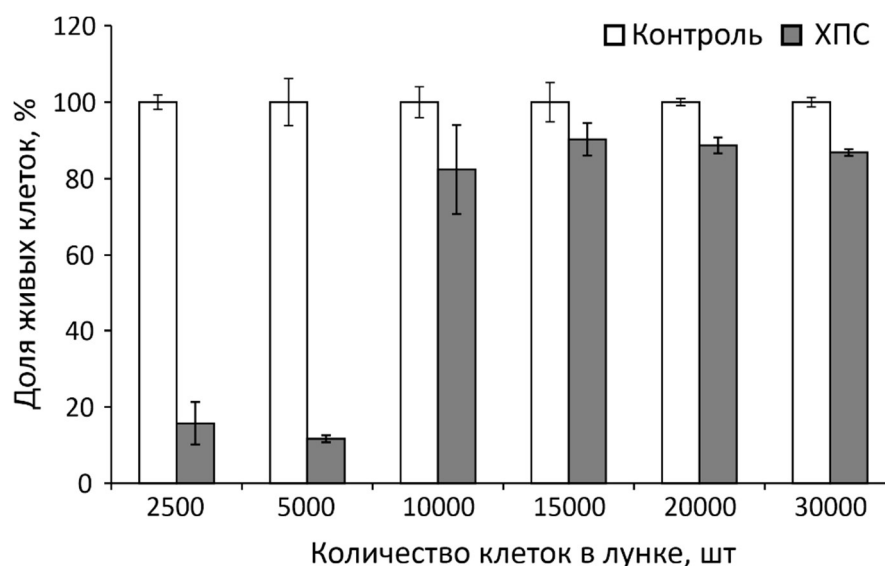


Рисунок 26 - Влияние прямого облучения ХПС на жизнеспособность клеток МХ-7 при 1 мин обработке различного количества клеток в лунке. Данные МТТ-теста, проведенного через 24 часа после воздействия. Параметры генератора плазмы: 3 кВ, гелий 3 л/мин, 13 кГц. Результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение.

На рисунке 27 можно видеть, что при облучении 2500 и 5000 клеток на лунку наблюдается сильный цитотоксический эффект, который отсутствует при облучении 10000 клеток и более. Такое резкое изменение жизнеспособности клеток можно объяснить тем, что на момент облучения конfluence клеток в первом случае составляла 50-70%, в то время как 10000 клеток и более через 24 часа формировали монослой.

Таким образом, можно сделать вывод, что ХПС в условиях *in vitro* способна оказывать цитотоксический эффект на клетки, и этот эффект зависит от количества облучаемых клеток.

Подводя итог, можно сделать вывод, что на биологический эффект холодной плазменной струи влияют продолжительность облучения, скорость газа, наличие заземленной подложки, частота, а также тип клеток и их количество (Таблица 2).

Таблица 2 - Параметры ХПС и биологический эффект

Параметр	Влияние на цитотоксический эффект ХПС
Продолжительность облучения	Да
Способ облучения	Нет
Состав газа	Нет
Скорость газа	Да
Напряжение	Нет в диапазоне 3.8-5.6 кВ
Наличие заземленной подложки	Да
Частота	Да
Расстояние от источника до облучаемого объекта	Нет в диапазоне видимого луча ХПС
Тип клеток	Да
Количество клеток	Да

3.2 Сравнение чувствительности нормальных и онкотрансформированных клеток человека к обработке ХПС

Исходя из проведенных экспериментов видно, что разные клеточные линии по-разному реагируют на облучения ХПС. Для перехода к противоопухолевой терапии важно подобрать такие условия, при которых достигается селективное цитотоксическое действие на раковые клетки. В ходе данной работы для подбора условий облучения варьировали

параметры: продолжительность облучения, введение в систему заземленной подложки и скорость газа.

3.2.1 Продолжительность облучения

Помимо прямого облучения, важно было подобрать условия для опосредованного облучения культуральной среды, для достижения максимального цитотоксического эффекта. В исследовании в качестве опухолевых моделей использовали линию клеток карциномы кожи человека A431 и линию нормальных клеток почки эмбриона человека НЕК 293. Полную культуральную среду DMEM:F12 обрабатывали ХПС с параметрами генератора плазмы: напряжение - 4,9 кВ, газ – аргон, 4 л/мин. Клетки культивировали в течение 22 ч в стандартных условиях а лунках электронных плашек клеточного анализатора iCELLigence RTCA, после чего заменяли $\frac{1}{2}$ объема среды в лунках на эквивалентный объем предварительно облученной среды. Момент замены среды указан стрелкой на рисунке 28.

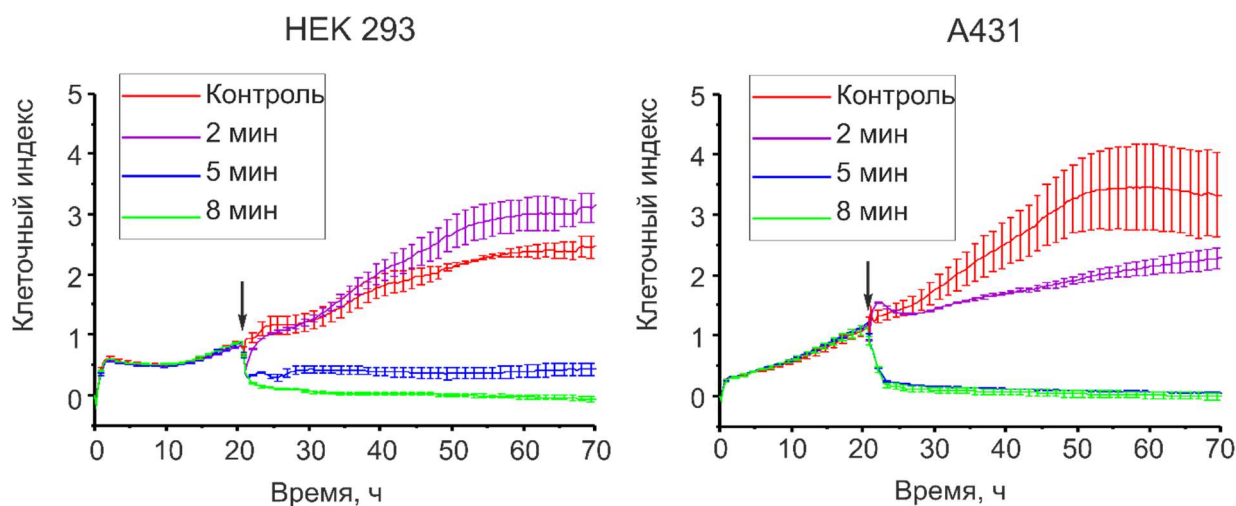


Рисунок 27 - Пролиферация клеток НЕК 293 и А431 в режиме реального времени. Стрелкой указан момент добавления среды, облученной ХПС. Параметры генератора плазмы: напряжение - 4,9 кВ, газ – аргон, 4 л/мин. Представлены характерные кривые роста клеток на приборе iCELLigence.

Анализ кривых роста клеток (Рисунок 28) показал, что обработка клеток А431 средой, облученной ХПС, приводит к снижению их пролиферации и/или гибели. Можно видеть, что добавление культуральной среды, облученной 2 мин к клеткам А431 вызывало снижение их жизнеспособности, тогда как для клеток НЕК293 такой эффект отсутствовал. Увеличение времени облучения вело к снижению жизнеспособности как раковых, так и здоровых клеток.

Таким образом показано, что культивирование клеток в среде, обработанной ХПС в течение 2 мин, оказывает большой эффект на опухолевые клетки А431 по сравнению с нормальными клетками НЕК 293.

Данные МТТ анализа (Рис. 29) подтверждают наблюдаемый эффект. Можно видеть, что при облучении 5 мин жизнеспособность клеток А549 снижается до 10% в то время как доля живых клеток НЕК 293 около 80% в тех же условиях облучения.

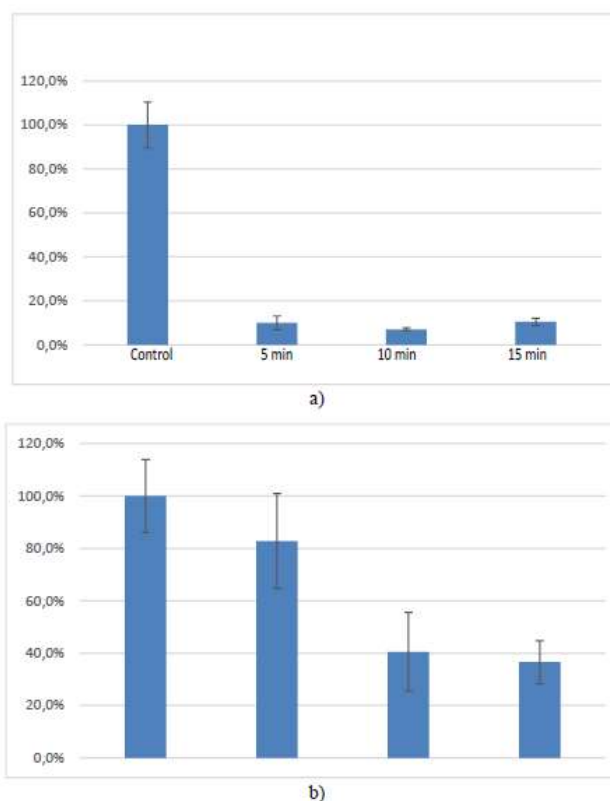


Рисунок 29 Зависимость цитотоксического воздействия ХПС на клетки от продолжительности облучения. Клетки НЕК 293 и А431 подвергали опосредованному облучению ХПС со следующими параметрами: напряжение - 4,9 кВ, газ – аргон, 4 л/мин..

Результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение.

Таким образом, показано, что можно подобрать такую продолжительность облучения, при которой ХПС оказывает большой цитотоксический эффект на опухолевые клетки по сравнению с нормальными.

3.2.2 Введение в систему заземленной подложки

Для сравнения чувствительности раковых и здоровых клеток к прямому облучению ХПС, клетки аденокарциномы молочной железы человека МСF7 и эпителиальные клетки нетрансформированной молочной железы человека МСF10А высаживали на планшеты

анализатора iCELLigence. Клетки обрабатывали ХПС в аргоне в течение 1 мин и 2 мин с использованием заземленной подложки и без нее. Жизнеспособность клеток оценивали в режиме реального времени (Рисунок 30).

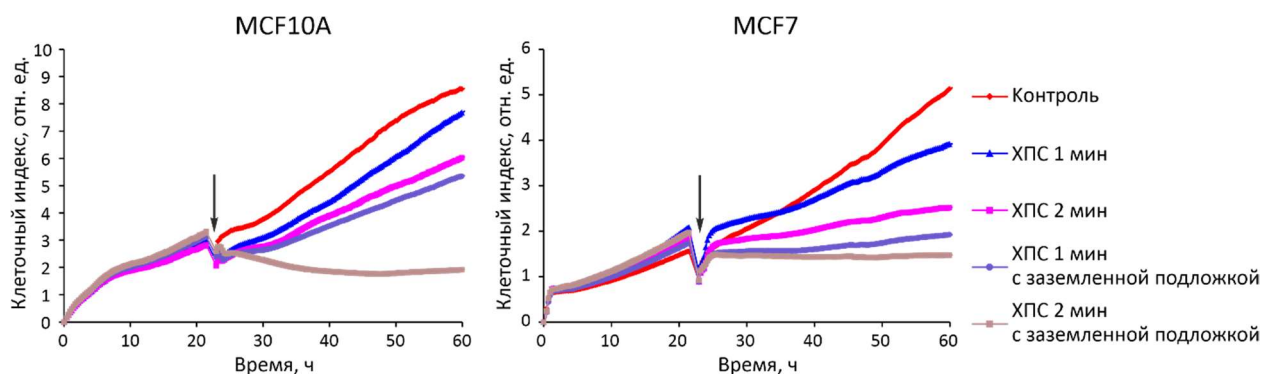


Рисунок 3028 - Влияние прямой обработки ХПС на пролиферацию клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF7 и эпителиальных клеток молочной железы человека MCF10A. Параметры генератора ХПС: 4,9 кВ, газ – аргон 3,5 л/мин. Представлены характерные кривые прибора iCELLigence. Стрелкой обозначен момент обработки.

При сравнении кривых жизнеспособности двух клеточных линий видно, что обработка ХПС снижает жизнеспособность как опухолевых клеток MCF7, так и здоровой молочной железы MCF10A. В отсутствие заземленного электрода клетки MCF10A были слабо чувствительны к воздействию ХПС даже при длительности облучения 2 мин. Введение в систему заземленного электрода вызывало резкую супрессию пролиферации клеток MCF10A при 2 мин облучения и незначительное снижение жизнеспособности при 1 мин облучения. В случае опухолевых клеток MCF7, уже 1 мин облучения с использованием заземленного электрода практически полностью подавляло жизнеспособность клеток.

Таким образом, облучение в течение 2 мин без использования заземленной подложки и в течение 1 мин с использованием заземленной подложки позволяет достичь селективного подавления жизнеспособности опухолевых клеток MCF7.

3.2.3 Выбор скорости газа

Для оценки влияния скорости потока газа на жизнеспособность, клетки аденокарциномы легкого человека A549 и фибробласты здорового легкого Wi-38 облучали ХПС, после чего через 24 ч культивирования в стандартных условиях анализировали жизнеспособность методом МТТ. Можно видеть, что использование струи в гелии со скоростью потока 9 л/мин оказывало значительно больший цитотоксический эффект по сравнению со скоростью 4 л/мин для раковых клеток A549. Для здоровых клеток Wi-38

цитотоксический эффект ХПС при потоке газа 9 л/мин и 4 л/мин достоверно не отличался. Таким образом показано, что использование потока газа 9 л/мин предпочтительно в отношении раковых клеток.

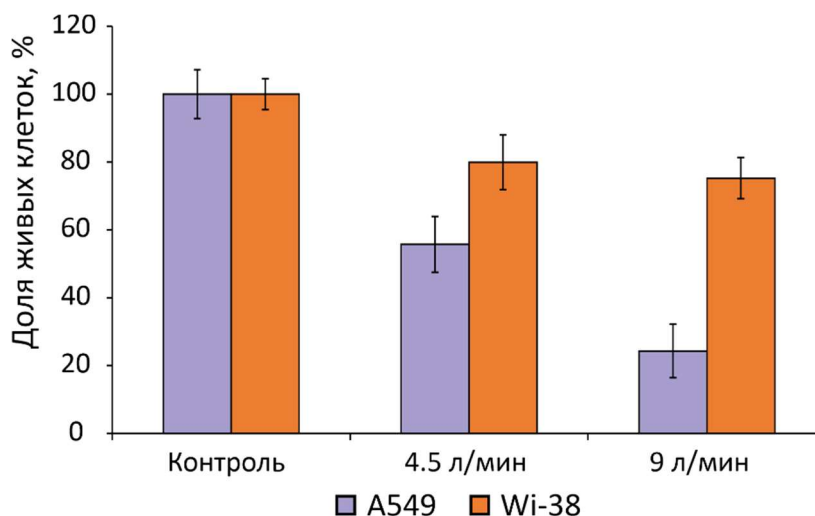


Рисунок 31 - Зависимость цитотоксического воздействия ХПС на клетки от скорости потока газа. Клетки A549 и Wi-38 подвергали прямому облучению ХПС со следующими параметрами: скорость гелия 4-9 л/мин, напряжение 4,5 кВ, частота 13 кГц, продолжительность облучения – 2 мин. Результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение.

По итогу проведенных экспериментов можно сделать вывод, что существуют экспериментальные условия облучения ХПС, избирательно индуцирующие гибель раковых клеток. При этом важно подбирать параметры облучения, чтобы добиться минимальных побочных эффектов по отношению к здоровым клеткам. Ключевое влияние оказывают продолжительность воздействия и скорость газа, а заземленная подложка усиливает цитотоксический эффект.

3.3 Определение активных форм кислорода и азота

Активные формы азота и кислорода считаются основными действующими веществами, ответственными за цитотоксический эффект ХПС, поэтому следующим этапом исследования стал анализ внеклеточных и внутриклеточных активных форм кислорода и азота, а также их транспорт в клетку через аквапориновые каналы.

3.3.1 Анализ изменения внеклеточных активных форм кислорода и азота, индуцированных культуральной средой, облученной холодной плазменной струей

3.3.1.1 Анализ изменения внеклеточных активных форм кислорода при культивировании клеток в среде, облученной ХПС

Для анализа изменения внеклеточных активных форм кислорода в результате добавления к клеткам облученной среды, полную среду для культивирования клеток DMEM:F12 обрабатывали ХПС и добавляли к культивируемым клеткам как $\frac{1}{2}$ от финального объема и продолжали культивирование в стандартных условиях. Через 30 мин, 1 ч и 6 ч после добавления облученной среды аликвоты среды отбирали и оценивали количество H_2O_2 в образце флуориметрическим методом. В процессе культивирования живых клеток вследствие метаболических процессов, происходит изменение концентрации АФК и АФА даже без внешних воздействий. Поэтому, в качестве одного из контролей использовали облученную культуральную среду DMEM:F12 без добавления к клеткам, а в качестве положительного контроля использовали среду от культивируемых клеток, к которым была добавлена H_2O_2 (50 мкМ). На рисунке 32 представлена динамика содержания H_2O_2 в культуральной среде после облучения. Можно видеть, что без добавления к клеткам (столбцы DMEM на гистограммах) концентрация перекиси в образцах облученной среды остается постоянной на протяжении анализируемого времени.

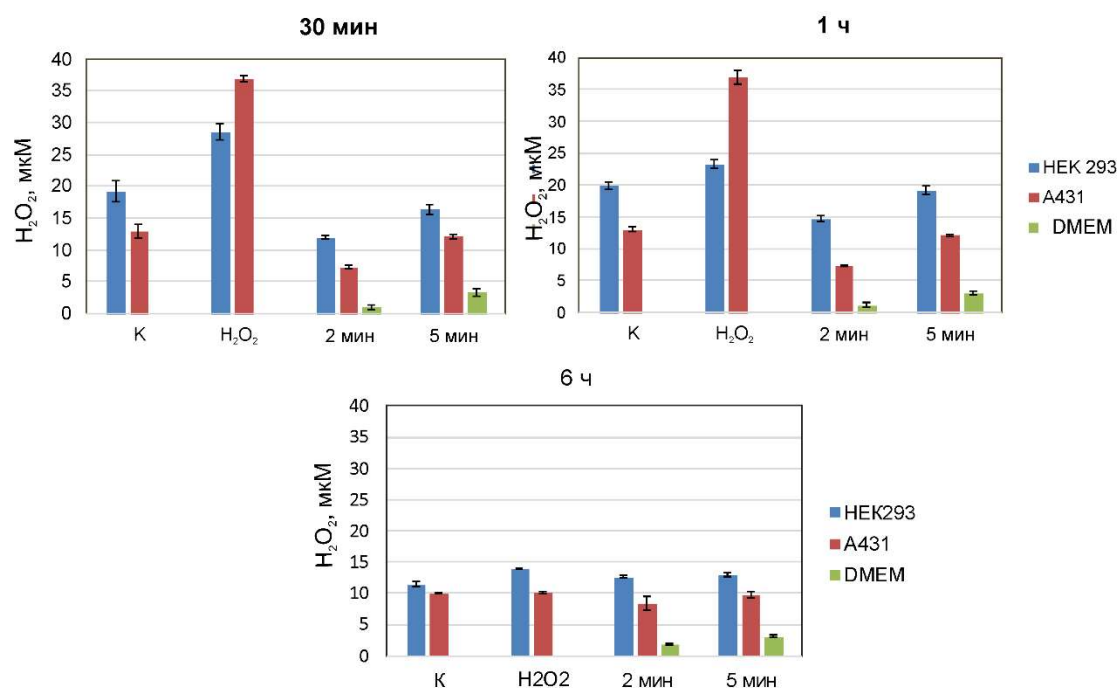


Рисунок 32 - Содержание H_2O_2 в культуральной среде при культивировании клеток A431 и HEK 293. Обработка культуральной среды ХПС в течение 2 и 5 мин. Параметры

генератора ХПС - 4,9 кВ, аргон 4 л/мин. К – клетки, культивируемые в среде без облучения; DMEM – облученная среда без культивирования с клетками. Результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение.

При добавлении к клеткам, в контрольном образце и в образце с экзогенной перекисью концентрация H_2O_2 уменьшается со временем. Поскольку в образцах среды от клеток, культивируемых со средой, облученной 2 мин, наблюдали относительное снижение концентрации внеклеточной перекиси через 30-60 мин после добавления, можно предположить, что облученная среда активирует транспорт H_2O_2 внутрь клеток. В то же время, эти различия исчезали к 6 ч инкубации. Можно предположить, что клеточные системы метаболизма корректируют концентрацию перекиси во внеклеточной среде.

Таким образом, не выявлено характерных изменений внеклеточной H_2O_2 при культивировании клеток в среде, активированной струей холодной плазмы.

3.3.1.2 Анализ изменения внеклеточных активных форма азота, при культивировании клеток в среде, активированной ХПС

Анализ изменения внеклеточных активных форма азота в культуральной среде на примере нитритов (NO_2^-) проводили спектрофотометрическим методом Грисса с использованием коммерчески доступного набора. По данным оптического поглощения образцов ($\lambda=540$ нм) строили калибровочную кривую и определяли концентрацию нитритов в среде. Облучение культуральной среды, добавление ее к клеткам и забор образцов среды проводили аналогично описанному для активных форм кислорода. На рисунке 33 представлены данные по содержанию нитритов в образцах культуральной среды после культивирования в ней клеток в течение 30 мин - 6 ч.

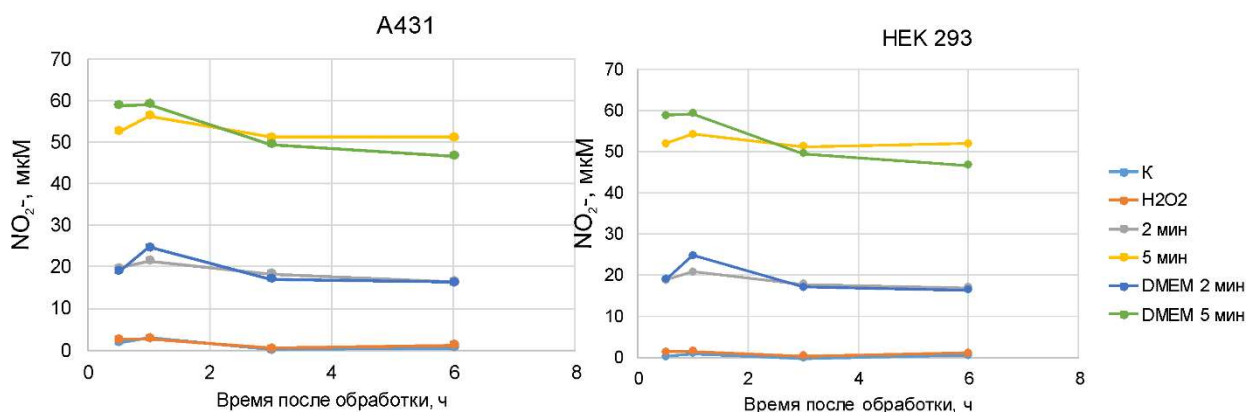


Рисунок 33 - Содержание NO_2^- в культуральной среде при культивировании клеток A431 и HEK 293. Обработка культуральной среды ХПС в течение 2 и 5 мин. К – клетки, культивируемые в среде без облучения; DMEM – облученная среда без культивирования с клетками.

Наибольшая концентрация нитритов в среде была в образцах, облученных ХПС 5 мин, как для образцов среды инкубируемых с клетками, так и для образцов без культивирования с клетками (DMEM), и такой характер содержания нитритов был общим как для опухолевых клеток A431, так и для нормальных клеток HEK 293. Концентрация нитритов в среде, облученной 5 мин по сравнению со средой, облученной 2 мин, была выше в 3 раза (около 60 мкМ и 20 мкМ, соответственно). При культивировании с клетками, концентрация нитритов в среде в течение 30 мин-6 ч изменялась незначительно, как в случае опухолевых клеток A431, так и для нормальных клеток HEK 293. Наиболее отличающейся экспериментальной точкой для 5 мин облучения является точка 30 мин после облучения, когда концентрация нитритов при культивировании с клетками ниже, чем в среде без клеток. Можно предположить, что часть нитритов проникает в клетки и активирует системы, ответственные за нейтрализацию таких активных форм азота. При анализе концентрации нитритов в образцах более поздних временных точек, облученных ХПС 5 мин, можно видеть, что культивирование с клетками стабилизирует постоянную концентрацию нитритов в среде по сравнению с облученной средой без клеток. Можно предположить, что повышенное содержание нитритов в среде при культивировании активирует клеточные системы, отвечающие за гомеостаз нитритов в клетке.

Таким образом, можно заключить, что облучение культуральной среды DMEM холодной плазменной струей индуцирует образование нитритов, и генерация нитритов зависит от продолжительности облучения. Не обнаружено достоверных различий в

концентрации нитритов в облученной среде при культивировании опухолевых и нормальных клеток человека.

3.3.2 Анализ изменения внутриклеточных активных форма кислорода, индуцированных культуральной средой, облученной холодной плазменной струей

Поскольку основными индукторами гибели клеток при воздействии холодной плазмы являются активные формы кислорода и азота (Vandamme et al., 2012), было важно оценить изменение этих активных частиц в клетках, подвергнутых прямому или опосредованному воздействию ХПС. Для этого к эмбриональным стволовым клеткам почки человека НЕК 293 и клеткам карциномы кожи человека А431 добавляли реагент H₂DCFDA, затем культивировали с облученной средой и анализировали клетки методом флуоресцентной микроскопии. Молекула H₂DCFDA способна проникать через клеточную мембрану, где в неизменном состоянии не флуоресцирует при облучении светом с длиной волны $\lambda=485$ нм. Под действием внутриклеточных эстераз происходит деацетилирование H₂DCFDA до H₂DCF, который накапливается в клетке, а дальнейшее окисление H₂DCF под действием внутриклеточных АФК и АФА способствует превращению его в 2',7'-дихлорофлуоресцеин (DCF⁻), обладающий флуоресценцией ($\lambda_{em}=530$ нм) при возбуждении светом с характеристической длиной волны $\lambda_{ex}=485$ нм (Yazdani, 2015). Концентрация DCF⁻ в клетке пропорциональна концентрации АФК и АФА, которые, таким образом, могут быть определены методами флуоресцентного анализа. Флуоресценцию H₂DCFDA детектировали в канале FITC (535 нм), где определяемым параметром было значение MFI (medium fluorescence intensity, средняя интенсивность флуоресценции). Клетки, культивируемые в стандартных условиях, использовали в качестве отрицательного контроля. На рисунке 34 представлены результаты анализа клеток А431 и НЕК 293.

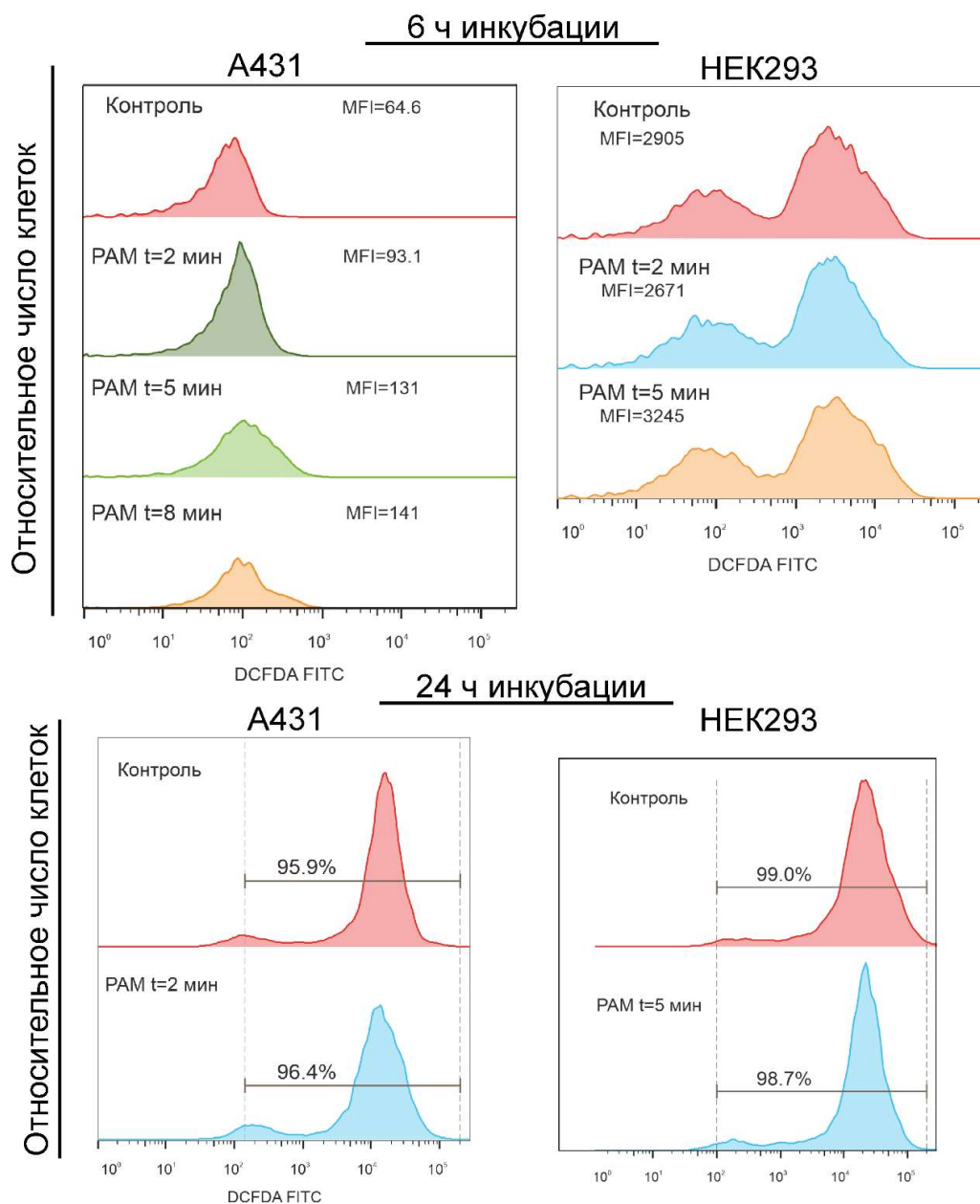


Рисунок 34 - Изменение количества активных форм кислорода и азота в клетках А431 и НЕК 293, инкубированных со средой, облученной ХПС. РАМ – обработка среды ХПС (plasma activated medium); MFI - средняя интенсивность флуоресценции; В процентах указана доля клеток с определенной интенсивностью H_2DCFDA

Обнаружено, что изменение MFI, отражающее относительное количество АФК и АФА, через 6 ч инкубации среды, обработанной ХПС (РАМ – plasma activated medium) в клетках А431 через 6 ч увеличивается дозозависимым образом, и максимально для клеток, к которым добавляли среду, облученную 8 мин – значение MFI увеличилось более чем в два раза относительно контрольных клеток. Таким образом, добавление облученной среды к опухолевым клеткам А431 вызывает увеличение внутриклеточных активных форм кислорода через 6 ч инкубации. В случае здоровых клеток НЕК 293, увеличение активных

форм кислорода не было отмечено для образцов клеток, инкубированных со средой, облученной 2 мин, а среда, облученная в течение 5 мин, вызывала увеличение количества внутриклеточных АФК и АФА (по параметру MFI) в среднем на 10% по сравнению с контролем.

Через 24 ч инкубации клеток с облученной средой не было отмечено увеличение внутриклеточных АФА и АФК как в здоровых клетках, так и в опухолевых. Наиболее вероятно, что при длительной инкубации происходит расхождение проникнувших в клетки АФА и АФК на взаимодействие с клеточными субстратами.

Таким образом, на ранних этапах инкубации клеток с ХПС-облученной средой селективно происходит увеличение АФА и АФК в опухолевых клетках. Этот факт подтверждает выдвинутую ранее нами гипотезу о том, что при добавлении среды, облученной ХПС к клеткам, происходит транспорт активных частиц внутрь клеток.

3.4 Анализ активации аквапориновых каналов под действием холодной плазменной струи.

Каналы, образованные белками семейства аквапоринов обеспечивают транспорт молекул воды и других малых частиц внутрь клеток. Поэтому, для исследования влияния среды, облученной ХПС на трансмембранную диффузию частиц через каналы в мембране клетки, были выбраны каналы, образованные аквапоринами. Анализ изменения экспрессии белков аквапориновых каналов проводили методом ПЦР в реальном времени с применением специфических праймеров. Ранее было показано, что аквапорины AQP-1, AQP-3 и AQP-8 вовлечены в транспорт пероксида водорода H_2O_2 , образующейся при облучении клеток ХПС [156]. Изменение относительного уровня мРНК аквапоринов (AQP-1 и AQP-8) в результате добавления ХПС-облученной среды проводили с использованием линий клеток A431 и HEK 293. Известно, что гены аквапоринов относят к генам быстрого ответа, поэтому оценку изменения уровня мРНК AQP проводили через 1 ч после культивирования с облученной средой (Рисунок 35).

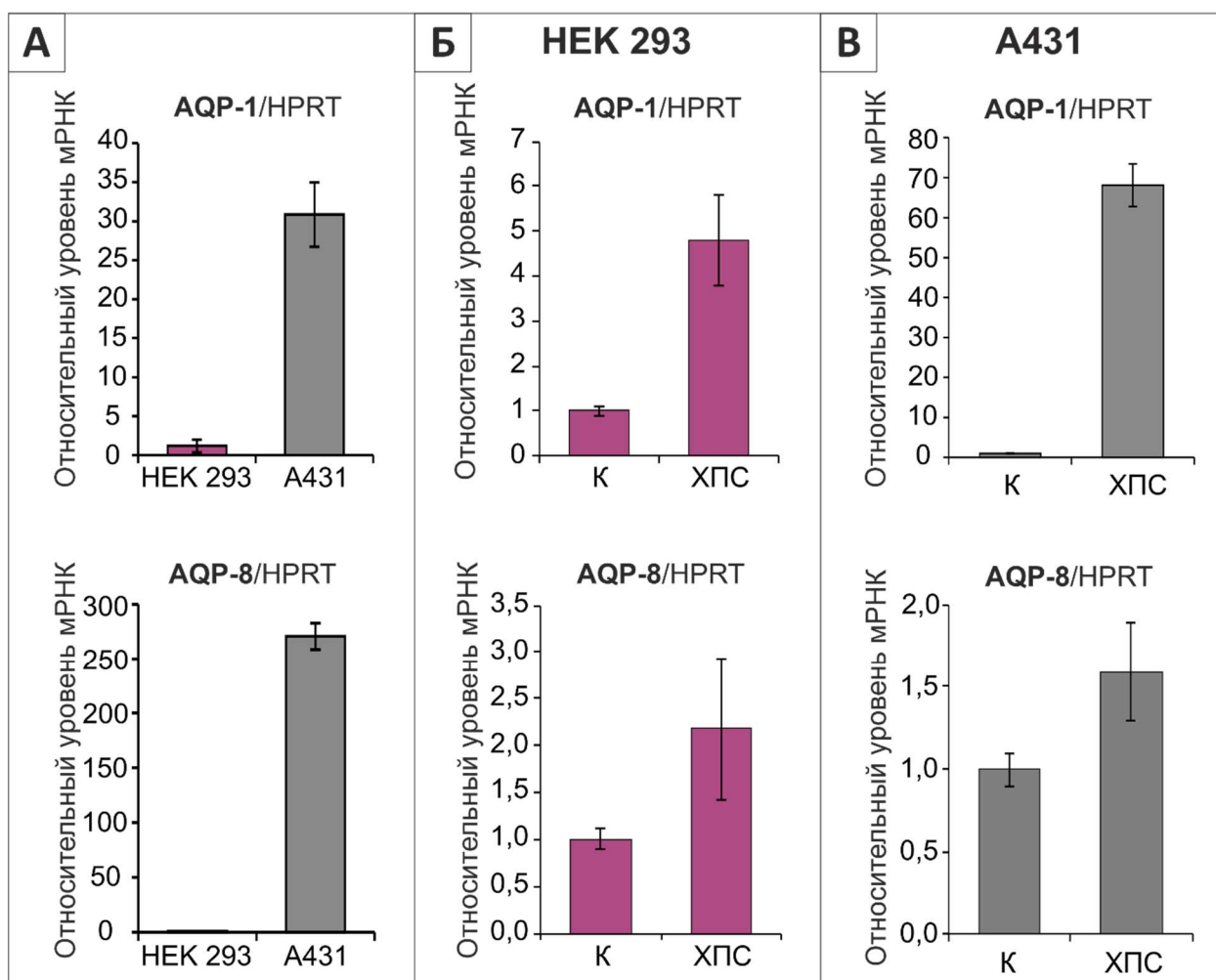


Рисунок 35 - Относительный уровень экспрессии мРНК AQP-1 и AQP-8 **А** - в культурах клеток A431 и HEK 293 до облучения, **Б** - в культуре клеток HEK 293, культивируемой в течение 1 ч в среде, облученной ХПС 5 мин, **В** - в культуре клеток A431, культивируемой в течение 1 ч в среде, облученной ХПС 5 мин. Уровень мРНК HPRT использовали в качестве внутреннего стандарта. Соотношение мРНК целевого гена/HPRT в клетках HEK 293 принимали за единицу на рисунке А, на рисунках Б и В - в контрольных клетках (К). Данные представлены как среднее значение соотношения целевого гена/ HPRT \pm SD.

В результате проведенного анализа (Рисунок 34) можно видеть, что базовый уровень AQP-1 и AQP-8 выше в раковых клетках A431 по сравнению со здоровыми HEK 293. Из литературных источников [157] известно, что такие тенденции являются характерными для многих культур раковых клеток. Помимо этого, можно видеть, культивирование со средой, облученной ХПС, приводит к увеличению уровня мРНК генов AQP-1 и AQP-8, как в здоровых, так и в опухолевых клетках. Положительная регуляция экспрессии гена AQP-1 средой, облученной ХПС была выше, чем для AQP-8, что говорит о том, что ген AQP-1 более чувствителен к действию ХПС-облученной среды. Более того, активация экспрессии

AQP-1 в раковых клетках была на порядок выше в опухолевых клетках, чем в здоровых клетках НЕК 293.

Таким образом, в ответ на облучение ХПС происходит активация экспрессии генов аквапоринов AQP-1 и AQP-8. Изначально более высокий уровень AQP в раковых клетках может способствовать лучшему транспорту АФА и АФК в раковые клетки и тем самым быть ответственным за селективность действия ХПС.

3.5 Исследование индукции клеточной гибели в клетках, облученных ХПС

Апоптоз – это тип программируемой клеточной гибели, при котором клетка распадается на фрагменты, окруженные мембраной, которые удаляются фагоцитирующими клетками, что предотвращает развитие воспаления. Для противоопухолевые агентов или физических методов воздействия на опухоли, апоптоз является предпочтительным типом гибели. Долю апоптотических клеток после культивирования в среде, облученной ХПС, определяли методом проточной цитометрии. В качестве опухолевой модели использовали клетки карциномы кожи человека А431 и клетки почки эмбриона человека НЕК 293. Для того, чтобы подтвердить индукцию апоптоза в клетках их окрашивали системой красителей AnnexinV-FITC/PI, после чего анализировали образцы методом проточной цитометрии (Рисунок 36).

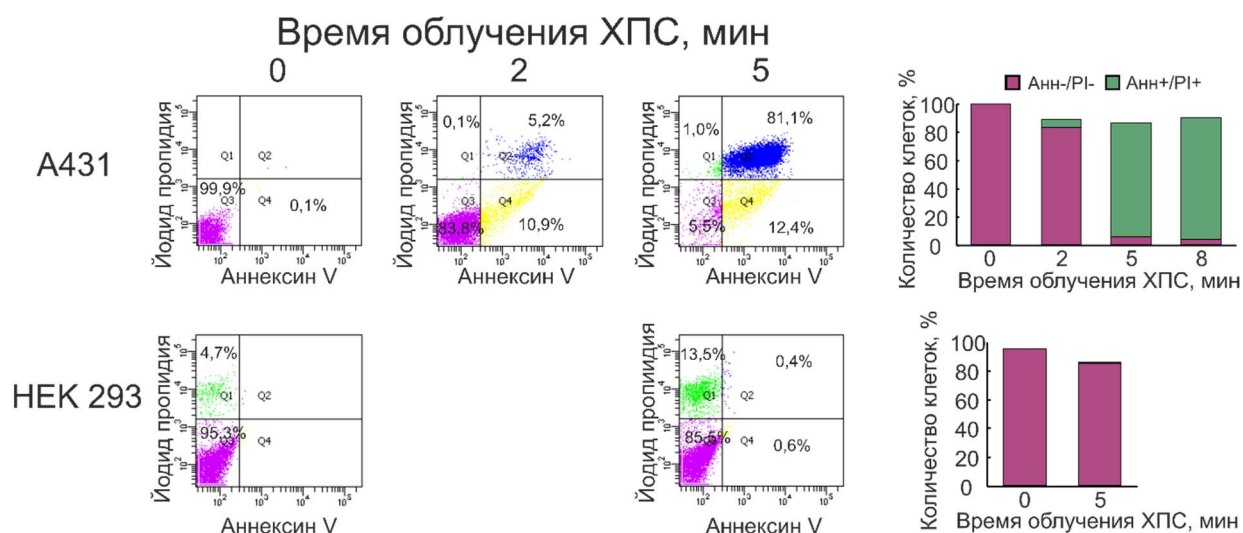


Рисунок 36 - Определение апоптотических клеток через 24 ч культивирования в ХПС-облученной среде методом проточной цитометрии. PI – йодид пропидия. Параметры ХПС: 4,9 кВ, газ – аргон 4 л/мин

Из данных, представленных на рисунке 36, видно, что для клеток А431 с увеличением времени облучения среды увеличивается доля ранних апоптотических клеток

(квадрант Q4, AnnexinV+/PI-). В случае НЕК 293 данная популяция практически отсутствует. Увеличение времени обработки среды с 2 до 5 мин для клеток А431 ведет к увеличению доли и апоптотических, и поздних апоптотических или вторично некротических клеток (квадрант Q2, AnnexinV+/PI+). Популяция интактных клеток, культивируемых со средой, облученной ХПС 5 мин, составила 5,5% для опухолевых клеток А431 и 85,5% для здоровых клеток НЕК 293, что указывает на большую чувствительность клеток А431 к действию облученной ХПС среды.

Таким образом, в клетках А431 ХПС-облученная среда вызывает преимущественно гибель клеток по типу апоптоза.

3.6 Исследование цитотоксической активности холодной плазменной струи в отношении 3D клеточной модели рака молочной железы человека

Поскольку в экспериментах *in vitro* показана чувствительность опухолевых клеток различного гистологического происхождения к действию холодной плазмы и культуральной среды, облученной плазмой (СО-ХПС), потенциал этого метода для противоопухолевой терапии оценивают как многообещающий, и уже определены категории больных, для которых облучение холодной плазмой может давать серьезные терапевтические эффекты (Dai et al., 2018). В то же время, число исследований биологических и химических эффектов холодной плазмы в отношении 3D клеточных моделей опухолей, которые позволяют выявить параметры облучения, при которых эффективно подавляется пролиферация большинства опухолевых клеток в составе сфероидов, пока невелико (Judée et al., 2016; Wiegand et al., 2016; Xu et al., 2016; Wanigasekara et al., 2022). Применение 3D клеточных моделей для доклинических исследований по сравнению с классическими 2D моделями имеет ряд преимуществ: они более точно отражают межклеточные взаимодействия, пространственную организацию рецепторов клеточной поверхности, распределение метаболитов и концентрации кислорода в межклеточном пространстве (Ferreira et al., 2018; Colombo & Cattaneo, 2021; Salinas-Vera et al., 2022). Поэтому, использование 3D сфероидов в качестве модели для облучения ХПС имеет существенное значение для последующей трансляции метода в клиническую практику.

В качестве 3D клеточной модели в работе использовали линию MCF7-EGFR, растущую преимущественно в виде сфероидов без использования матриц и ростовых факторов. Культура клеток MCF7-EGFR была получена на основе клеток MCF7, в геном которых методом ретровирусной трансдукции была встроена последовательность, кодирующая полноразмерный белок EGFR (Troitskaya et al., 2021). Использование

сфероидов MCF7-EGFR, растущих без гидрогелей и ростовых факторов, позволило упростить систему оценки реакции клеток сфероидов на стимулы, и не учитывать дополнительно эффекты от воздействия ХПС на гидрогели и факторы роста.

3.6.1 Изменение морфологии сфероидов и жизнеспособности клеток в составе сфероидов при прямом облучении ХПС и в присутствии СО-ХПС.

Изменение морфологии многоклеточных сфероидов MCF7-EGFR после прямого и опосредованного облучения ХПС анализировали методом микроскопии в проходящем свете.

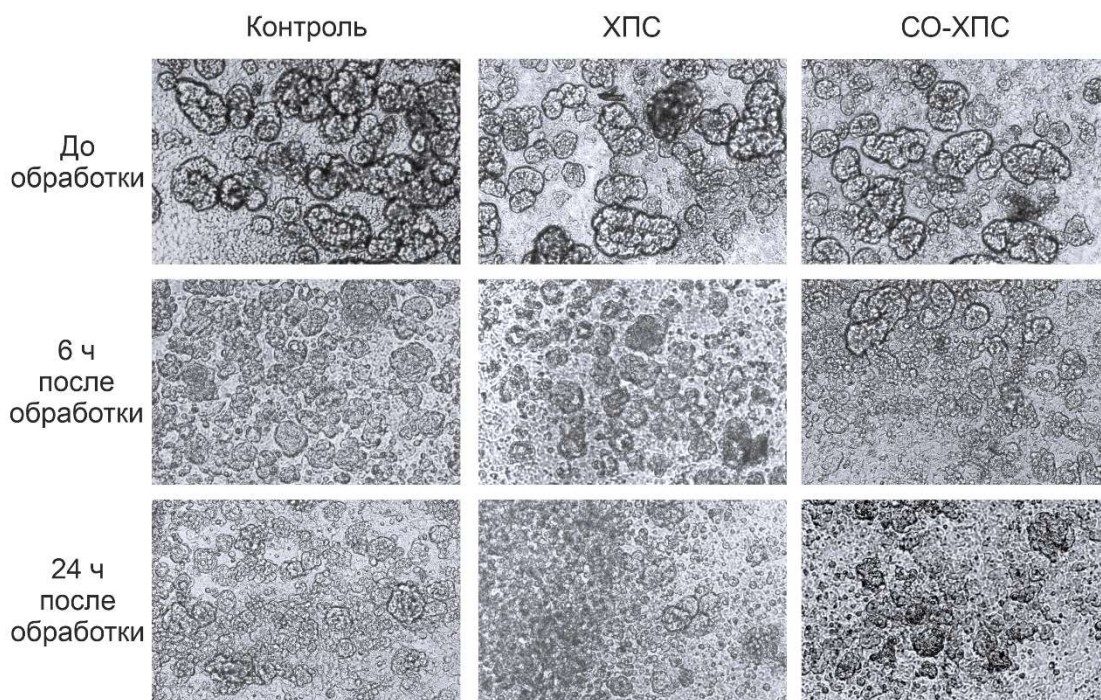


Рисунок 29 - Анализ прямого облучения клеток ХПС- и СО-ХПС на морфологию 3D культуры MCF7-EGFR. Параметры генерации ХПС: 4,5 кВ, 13 кГц, газ - гелий, 9 л/мин. Представлены характерные изображения препаратов, полученных методом микроскопии в проходящем свете до облучения и через 6ч и 24 ч после облучения.

На рисунке 37 представлен характерный вид сфероидов до облучения и через 6 ч и 24 часа после облучения. Можно видеть, что через 24 ч после облучения происходит разрушение крупных сфероидов до более мелких и до отдельных клеток как при прямом облучении, так и при культивировании с СО-ХПС.

Мы наблюдали, что как при прямом облучении, так и при воздействии СО-ХПС на сфероиды, происходит деструкция сфер до единичных клеток. Такое наше наблюдение хорошо согласуется с результатами других авторов о том, что одним из эффектов обработки клеток холодной плазмой является снижение их адгезионной, миграционной и инвазивной способностей (Semmler et al., 2020). Предполагают, что ХПС стимулирует негативную

регуляцию интегринов – белков, располагающихся на поверхности клеток и формирующих межклеточные контакты (Shashurin et al., 2010). Наиболее вероятно, что наблюдаемая нами деструкция сфероидов также обусловлена уменьшением интегринов на поверхности облученных клеток и ослаблением межклеточных контактов в сфероиде.

Изменение жизнеспособности клеток сфероидов в ответ на облучение ХПС оценивали по изменению доли клеток в состоянии позднего апоптоза/некроза. Для этого применяли метод проточной цитометрии с окрашиванием йодидом пропидия (PI). Йодид пропидия проникает в ядра гибнущих клеток с поврежденной плазматической мембраной, и такие клетки можно визуализировать флуоресцентными методами анализа.

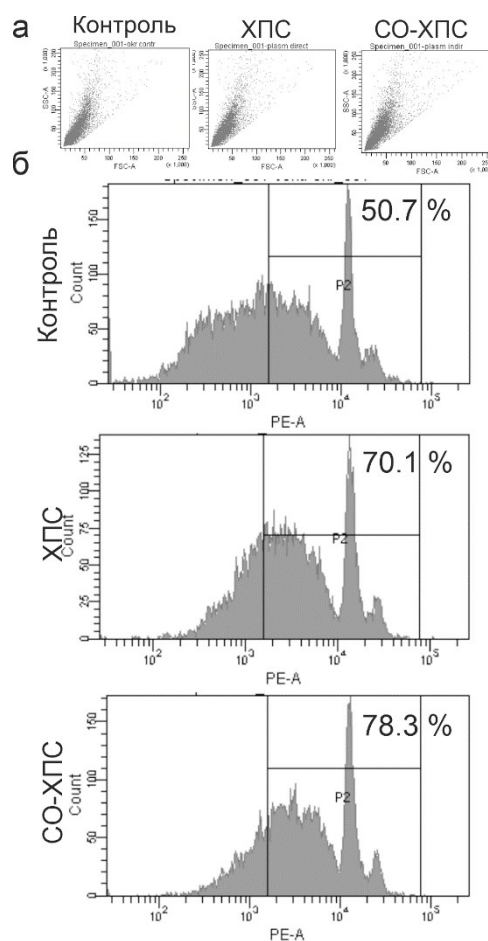


Рисунок 30 - Изменение жизнеспособности клеток сфероидов MCF7-EGFR после прямой обработки ХПС и СО-ХПС. Параметры генерации ХПС: 4,5 кВ, 13 кГц, газ - гелий, 9 л/мин. Через 24 ч после воздействия сфероиды диссоциировали на отдельные клетки, образцы клеток инкубировали с йодидом пропидия (PI) и анализировали методом проточной цитометрии. Представлены распределение клеток по параметрам прямого и бокового светорассеяния (а), а также гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в канале PE-A (б).

Сравнение доли PI-положительных клеток (%), подвергнутых прямому облучению и СО-ХПС при выбранных условиях показало, что инкубация сфероидов с СО-ХПС вызывало несколько больший цитотоксический эффект: ~ 78 % клеток были PI-положительными, по сравнению с ~ 70% при прямой обработке ХПС (Рис. 38). Стоит отметить, что обработка сфероидов раствором Accutase для диссоциации на отдельные клетки с последующим мягким пипетированием, приводили к тому, что в контрольных необлученных образцах доля PI-положительных клеток была высокой и составляла до 50%.

3.6.2 Изменение активных форм кислорода в клетках сфероидов, подвергнутых прямому или опосредованному воздействию ХПС.

Поскольку при облучении клеток в виде монослоя было показано увеличение внутриклеточных активных форм кислорода и азота, было важно оценить изменение этих активных частиц в клетках сфероидов MCF7-EGFR, подвергнутых прямому или опосредованному воздействию ХПС. Для этого к облученным сфероидам или сфероидам, культивируемым с облученной средой, добавляли реагент H₂DCFDA и анализировали сфероиды методом флуоресцентной микроскопии.

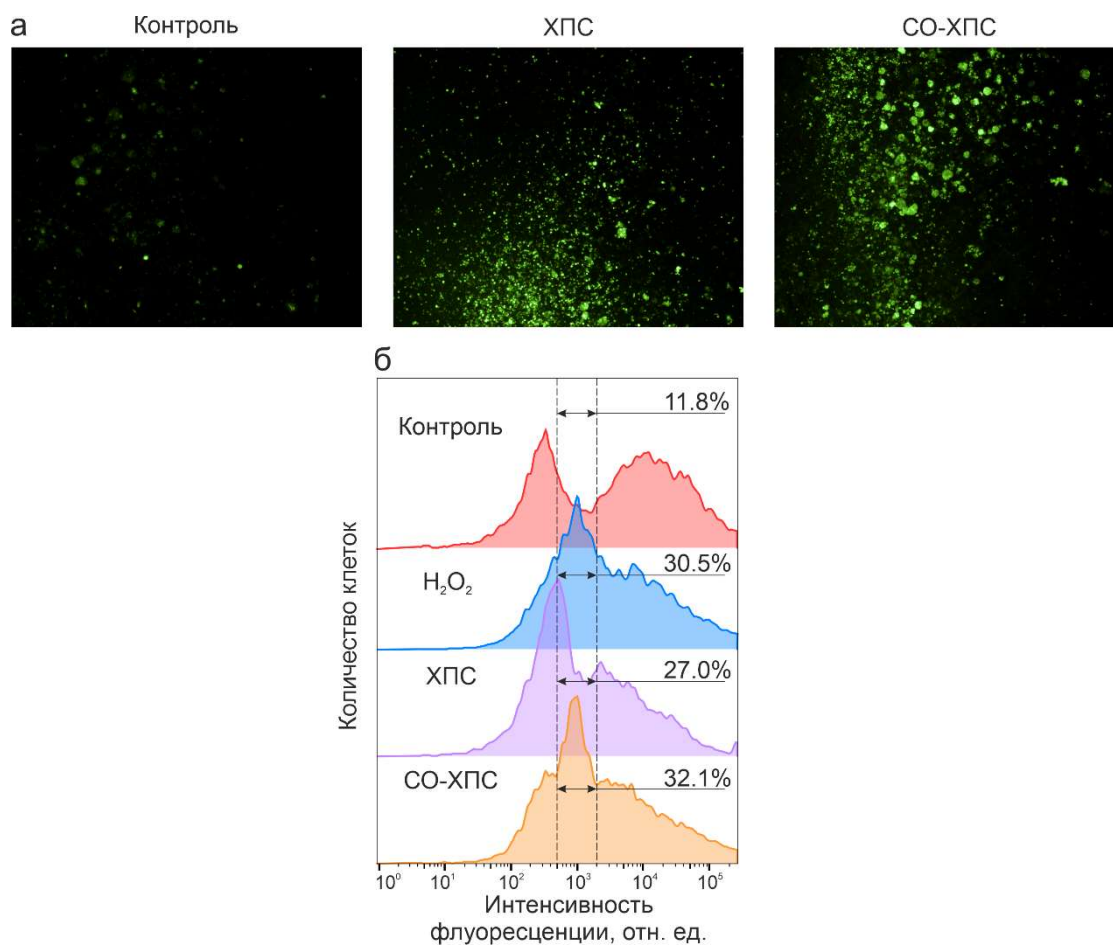


Рисунок 39 - Изменение АФК и АФА в клетках 3D сфероидов MCF7-EGFR после воздействия ХПС. Параметры генерации ХПС: 4,5 кВ, 13 кГц, газ - гелий, 9 л/мин. Данные

флуоресцентной микроскопии (а) и проточной цитометрии (б) для клеток сфероидов через 6 ч после облучения. Представлены характерные образцы анализа.

Мы обнаружили, что как при прямом облучении ХПС, так и при воздействии СО-ХПС, в образцах сфероидов значительно усиливался зеленый сигнал, указывающий на присутствие АФК/АФА в клетках. Изменение АФК/АФА в облученных клетках удалось оценить методом проточной цитометрии при мягком разделении сфероидов на отдельные клетки непосредственно перед анализом. В качестве положительного контроля использовали сфероиды, к которым добавляли 5% раствор H_2O_2 , который является субстратом H_2DCFDA . Анализ показал, что при опосредованном способе воздействия ХПС, доля клеток сфероидов с увеличенным содержанием АФК/АФА была незначительно больше, чем при прямом облучении (Рис. 39) при используемых условиях облучения.

Активные формы кислорода и азота являются продуктами жизнедеятельности клетки, которые постоянно образуются в ходе метаболизма и участвуют в регуляции сигнальных каскадов. При этом известно, что в опухолевых клетках концентрации АФК и АФА повышены в результате более интенсивного метаболизма (Arfin et al., 2021). Как уже отмечалось ранее, основной вклад в цитотоксическое действие ХПС вносят активные формы кислорода и азота (Graves, 2012; Yousfi et al., 2014). Идентификация и количественное определение конкретных активных частиц в биологических образцах затруднительно из-за большого их разнообразия и локализации. Поэтому применяют косвенные методы, основанные на окислительно-восстановительных превращениях молекул-индикаторов окислительного стресса, таких как H_2DCFDA . Используя H_2DCFDA , мы показали, что воздействие СО-ХПС на сфероиды MCF7-EGFR вело к большему накоплению активных форм кислорода в обработанных клетках, чем при прямом воздействии. В работе (Yousfi et al., 2014) показано, что однократное добавление среды, облученной ХПС к сфероидам, образованным клетками карциномы головы и шеи FaDu, не вело к торможению роста сфероидов, но стимулировало открепление отдельных клеток от многоклеточной 3D структуры, что хорошо согласуется с полученными нами данными. Цитотоксического воздействия в отношении сфероидов FaDu удалось добиться при многократном добавлении среды, облученной ХПС. Авторы предполагают, что низкая чувствительность к активированной среде при однократном добавлении объясняется резистентностью клеток FaDu к H_2O_2 . Поскольку мы показали изменение относительного количества активных форм кислорода после воздействия ХПС на сфероиды MCF7-EGFR, можно говорить о том, что это изменение опосредует цитотоксический ответ сфероидов MCF7-EGFR на ХПС-активированную среду и прямое облучение.

Таким образом, сфероиды MCF7-EGFR чувствительны как к прямому облучению ХПС, так и к воздействию СО-ХПС, и эти воздействия сопровождаются изменением содержания активных форм кислорода внутри клеток.

3.6.3 Захват фагоцитирующими клетками клеток сфероидов, облученных ХПС.

Для того, чтобы оценить возможность захвата облученных сфероидов клетками с фагоцитарной активностью, сфероиды предварительно окрашивали флуоресцентным красителем цитоплазмы, подвергали прямому облучению ХПС, после чего через 24 ч добавляли к активированным моноцитам ТНР-1. Активированные моноциты характеризуются фагоцитарной активностью, а их окрашивание флуоресцентным красителем позволяет визуализировать захват флуоресцентного субстрата методом флуоресцентной микроскопии (Рис. 40а).

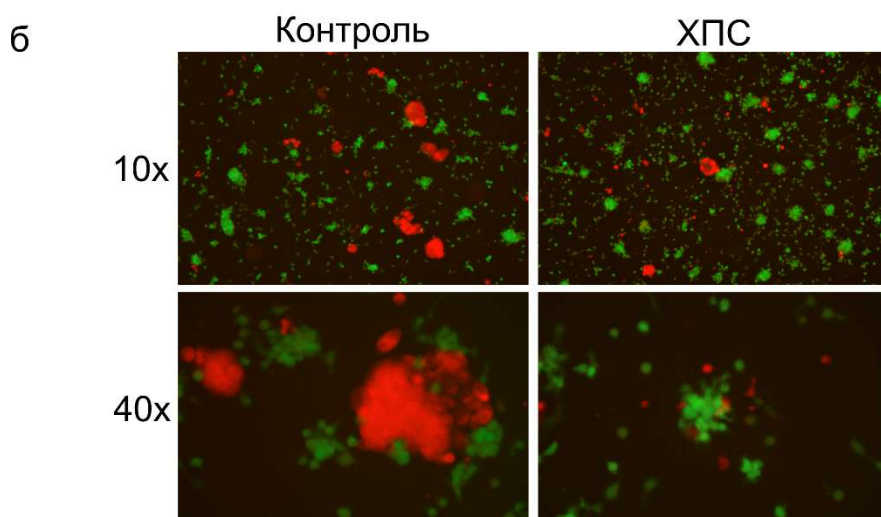
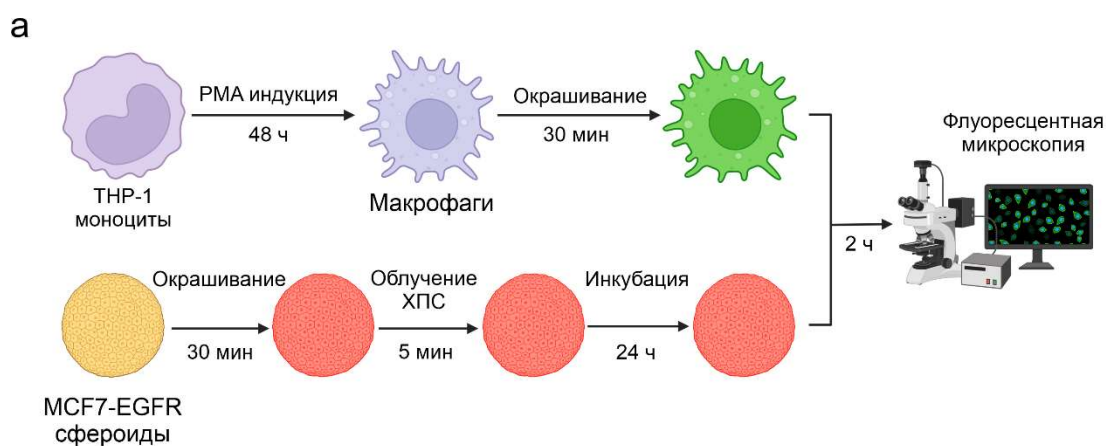


Рисунок 40 - Фагоцитарная активность макрофагов в отношении сфероидов MCF7-EGFR, облученных ХПС. Параметры генерации ХПС: 4,5 кВ, 13 кГц, газ - гелий, 9 л/мин.

а - схема эксперимента. б – анализ фагоцитоза методом флуоресцентной микроскопии через 2 ч после добавления сфероидов к макрофагам; красным флуоресцентным

красителем окрашены сфероиды, зеленым флуоресцентным красителем окрашены макрофаги.

Из данных, представленных на рисунке 40б можно видеть, что облучение вызывает дезинтеграцию клеток сфероидов, которые подвергаются захвату макрофагами, что выражается в со-локализации зеленого и красного флуоресцентных сигналов.

Неэффективное удаление гибнущих опухолевых клеток фагоцитирующими клетками ведет к развитию воспалительных реакций. Макрофаги реагируют на комбинацию молекулярных сигналов, испускаемых погибающими клетками, после чего происходит фагоцитоз. Ранее мы уже показали, что облучение опухолевых клеток ведет к активации в них сигналов, распознаваемых фагоцитирующими клетками как сигналы “найди меня” и “съешь меня” (Troitskaya et al., 2020). Можно предположить, что в случае облучения ХПС солидных опухолей *in vivo*, также возможна деструкция опухоли на отдельные опухолевые клетки, в которых активируются процессы гибели, и они будут эффективно удаляться клетками иммунной системы с фагоцитарной активностью. Такое развитие событий на клеточном уровне препятствует процессам воспаления, что улучшает ответ на терапию.

3.7 Исследование противоопухолевых эффектов холодной плазменной струи *in vivo*

3.7.1 Исследование термических побочных эффектов при облучении ХПС

При переходе от экспериментов на клетках к экспериментам на животных важно определить режимы облучения, не вызывающие ярких токсических эффектов, как например, ожоги кожи в месте контакта с плазменной струей. Как уже было показано выше, на температуру струи существенно влияет скорость потока газа и напряжение. Эксперименты проводили на здоровых мышах СЗН/Не без опухолей с использованием заземленной подложки и без нее (Рисунок 41). В месте предполагаемого облучения у животных выбривали участок для облегчения наблюдения за состоянием кожи и оценивали его состояние через 24 ч после облучения. При следующих параметрах облучения наблюдали термический ожог или появление белесого пятна как в случае облучения с подложкой, так и без нее: частота 25 кГц, напряжение 5 кВ, гелий 3 л/мин, 1 мин облучения (Рисунок 41, б, в). Снижение напряжения до 3.5 кВ и скорости газа до 3 л/мин устраняла появление ожога как в случае использования заземленной подложки, так и без нее. Снижение частоты до 13 кГц при напряжении 5 кВ и скорости гелия 9 л/мин устраняла все указанные нежелательные кожные реакции (Рисунок 41, г) как в случае использования заземленной подложки, так и без нее. По результатам эксперимента были выбраны

нетоксичные условия формирования струи (до 13 кГц, 5 кВ, гелий 9 л/мин, 1 -2 мин облучения) для исследования противоопухолевого потенциала ХПС на животных.

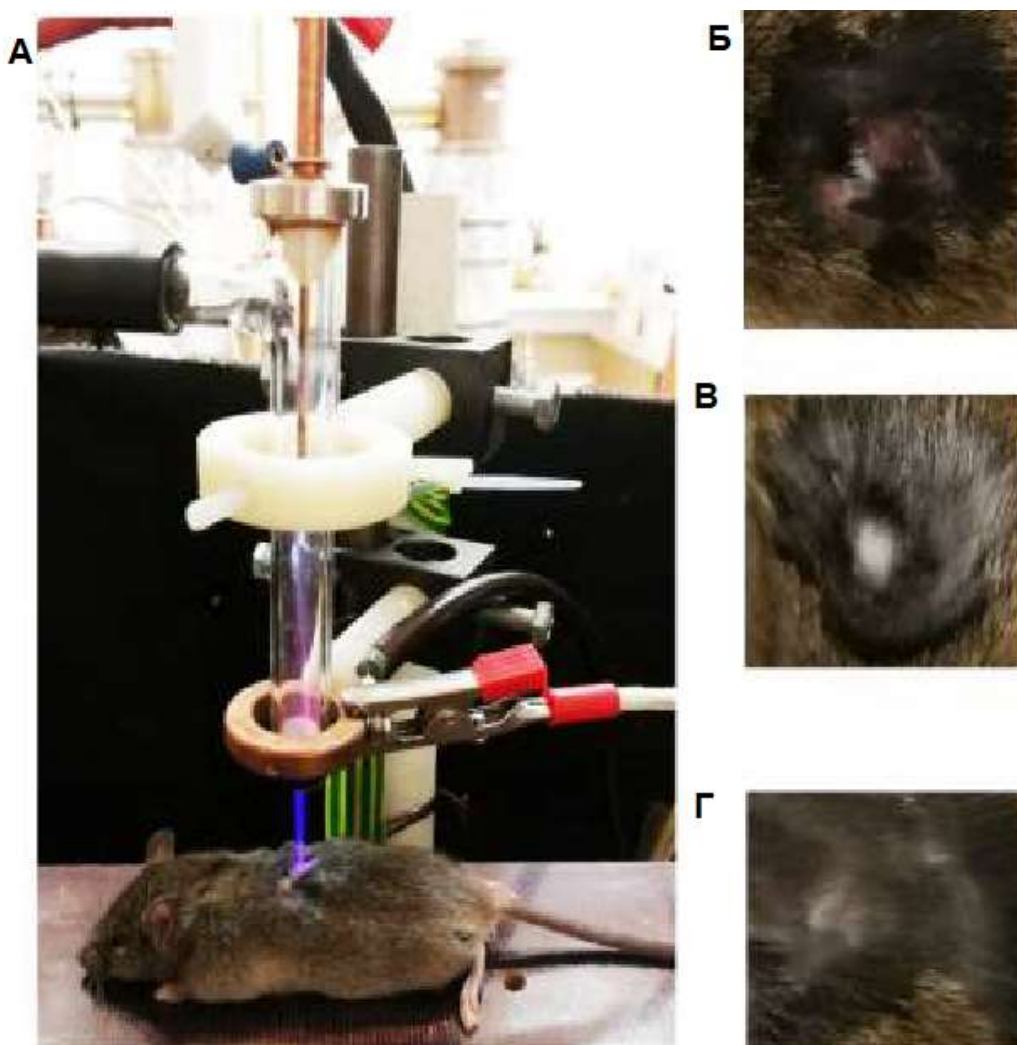


Рисунок 31 - Исследование термических побочных эффектов при облучении ХПС. А. фото процесса облучения; Б. термический ожог в виде покраснения; В. белесое пятно; Г. неповрежденная кожа.

3.7.2 Облучение опухолей, образованных клетками глиобластомы человека U87MG

Мышам линии SCID перевивали опухолевые клетки U87MG в количестве 6×10^6 клеток/мышь подкожно в объеме 100 мкл в PBS с матригелем (PBS:матригель 1:1). Облучение начинали, когда опухоли у всех животных хорошо пальпировались, средний объем опухолей составлял $126,83 \pm 15,62$ мм³. Параметры облучения ХПС на область опухоли: скорость гелия 3 л/мин, $U = 3$ кВ, время облучения 2 минуты. Всего животные были облучены 5 раз. В эксперимент была добавлена группа, где облучение животных проводили с заземленной подложкой. Кроме того, интересно было сравнить эффекты

ХПС в воздухе и в парах воды (условия увлажнения ~55%). Согласно данным математического моделирования (данные не опубликованы), увеличение влажности с 30% до 60%, и далее, до 95% ведет к существенному увеличению концентрации ОН-радикалов в области контакта струи с биологическим объектом. Предполагалось, что увеличение концентрации ОН-радикалов должно усиливать цитотоксические эффекты. Поэтому, группы облучения ХПС с подложкой и без нее были продублированы в условиях увлажнения. На рисунке 39 представлена динамика изменения объема опухолей в экспериментальных группах на протяжении 13 дней с первого облучения.

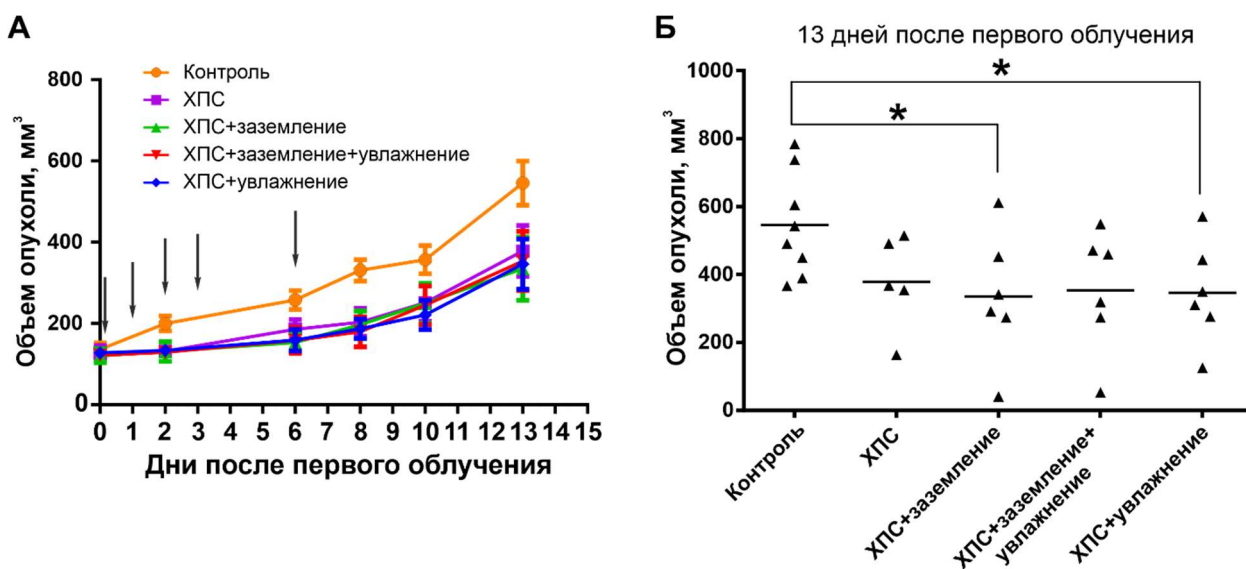


Рисунок 32 - Результаты прямого облучения подкожных опухолей U87MG. А: Стрелками обозначены дни облучения, данные представлены как среднее \pm SD. Б: Средний и индивидуальный объем опухолей в группах на 13-й день после первого облучения. * - различия между группами считали достоверными при $p < 0.05$ (критерий Манна-Уитни).

Можно видеть, что достоверно отличались от контроля объемы опухолей в группах “ХПС+заземление” и “ХПС+увлажнение”, для которых индекс торможения роста опухоли (ТРО) составил 38,5% и 36,6%, соответственно.

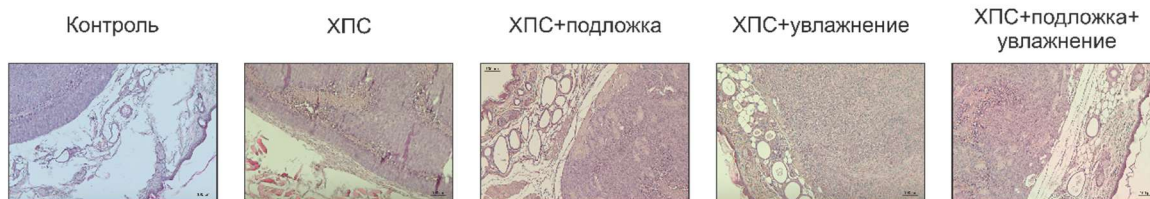
Таким образом, применение как заземления, так и увлажнения при облучении опухолей позволяет достигать существенных противоопухолевых эффектов.

1.1.1. Анализ гистологических изменений у животных в месте воздействия холодной плазменной струи.

У животных из экспериментов по подавлению роста опухоли U87MG на момент окончания эксперимента были вырезаны опухоли, из которых были приготовлены

парафиновые блоки для последующего гистологического анализа. На рисунке X представлены характерные гистологические образцы срезов опухолей U87MG.

1. Верхняя часть опухоли с кожей



2. Центральная часть опухоли



3. Нижняя часть опухоли с прилегающей соединительной тканью

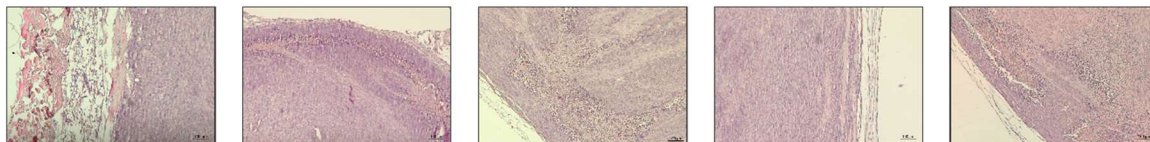


Рисунок 33 Гистологический анализ образцов опухолей после облучения ХПС.

Срезы ткани окрашены гематоксилином и эозином. Световая микроскопия (10х)

На срезах образцов опухолей, облученных ХПС (САР) хорошо заметны зоны воспаления. В случае ХПС с подложкой, видно, что верхняя краевая часть опухоли остается структурно неизменной, сохраняется структура жировой прослойки. При анализе верхней части опухоли, которая непосредственно подвергается контакту с ХПС можно видеть, что прямое облучение без подложки и увлажнения выглядит наиболее травматичным по изменению подкожной жировой прослойки.

Применение заземленной подложки и повышение влажности воздуха снижают травматическое воздействие ХПС на подкожные слои жировой клетчатки в зоне контактов со струей плазмы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе был исследован цитотоксический и противоопухолевый эффекты холодной плазменной струи (ХПС) *in vitro* и *in vivo*. Показано, что облучение ХПС приводит к снижению жизнеспособности клеток, этот эффект усиливается пропорционально времени облучения. На цитотоксический эффект холодной плазменной струи влияют продолжительность облучения, скорость газа, наличие заземленной подложки, частота, а также тип клеток и их количество. Было показано, что изменение продолжительности облучения, введения в систему заземленной подложки и скорости газа позволяет определить условия, вызывающие преимущественную гибель опухолевых клеток без цитотоксических эффектов на здоровых клетках.

Исследовано проникновение действующих веществ холодной плазмы, активных форм азота и кислорода, в облученные клетки. Показано, что облучение ХПС культуральной среды приводит к увеличению концентрации этих веществ как внутри, так и вне клетки, что говорит, об участии активных форм азота и кислорода в цитотоксическом действии ХПС. Показано, что облучение ХПС ведет к активации экспрессии генов аквапоринов AQP-1 и AQP-8, отвечающих за транспорт малых молекул во внутриклеточное пространство, что подтверждает роль активных форм азота и кислорода в гибели клеток. При исследовании механизма гибели клеток было установлено, что ХПС-облученная среда вызывает преимущественно гибель клеток по типу апоптоза.

Облучение сфероидов MCF7-EGFR вело к деструкции многоклеточных 3D структур на отдельные клетки с активацией в них процессов гибели. Показано, что клетки облученных сфероидов подвергаются фагоцитозу активированными макрофагами. При сравнении прямого воздействия ХПС и культивирования сфероидов MCF7-EGFR в среде, облученной ХПС, обнаружено большее содержание активных форм кислорода и азота в клетках сфероидов при культивировании в облученной среде, что далее ведет к большему цитотоксическому эффекту, чем при прямом облучении.

Прямое облучение ХПС подкожных опухолей глиобластомы человека U87MG приводит к торможению роста опухоли. Использование заземленной подложки и увлажнение усиливают противоопухолевый эффект.

Таким образом, было показано, что ХПС обладает цитотоксической и противоопухолевой активностью. Полученные данные об проникновении активных форм кислорода и азота будут полезны для понимания закономерностей механизма их противоопухолевого действия. Подбор подходящих параметров облучения среди тех, которые оказывают влияние на цитотоксический эффект, позволит впоследствии внедрить ХПС в клиническую практику.

ВЫВОДЫ

1) На цитотоксический эффект холодной плазменной струи (ХПС) влияют продолжительность облучения, скорость газа, наличие заземленной подложки, частота, а также тип клеток и их количество.

2) Определены условия ХПС, вызывающие преимущественную гибель опухолевых клеток A431, A549 и MCF7 без цитотоксических эффектов на здоровых клетках НЕК 293, Wi-38 и MCF10A, соответственно. Использование заземленной подложки, подбор времени облучения и оптимальной скорости газа позволяет усилить цитотоксический эффект ХПС в отношении опухолевых клеток.

3) Облучение ХПС культуральной среды (опосредованное воздействие) индуцирует образование в ней нитритов, и генерация нитритов зависит от продолжительности облучения. Добавление облученной ХПС среды к клеткам не ведет к увеличению концентрации внеклеточной H_2O_2 .

4) Непрямое облучение клеток ХПС вызывало увеличение концентраций внутриклеточных активных форм кислорода и азота. Увеличение времени облучения вело к увеличению концентрации этих форм.

5) Культивирование клеток в присутствии среды, облученной ХПС, ведет к активации экспрессии генов аквапоринов AQP-1 и AQP-8.

6) Сфероиды MCF7-EGFR чувствительны как к прямому облучению ХПС, так и к воздействию культуральной среды, облученной ХПС, и эти воздействия сопровождаются изменением содержания активных форм кислорода внутри клеток и дезинтеграцией клеток сфероидов, которые подвергаются захвату макрофагами

7) Прямое облучение ХПС подкожно трансплантированных опухолей глиобластомы человека U87MG приводит к торможению роста опухоли. Использование заземленной подложки и увлажнение усиливают противоопухолевый эффект.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Schweigert I., Zakrevsky D., Gugin P., Yelak E., **Golubitskaya, E. (Patrakova E.)**, Troitskaya O., Koval O. (2019). Interaction of Cold Atmospheric Argon and Helium Plasma Jets with Bio-Target with Grounded Substrate Beneath. *Applied Sciences*, 9(21), 4528.
2. **Golubitskaya E. A. (Patrakova E.A.)**, Troitskaya O. S., Yelak E. V., Gugin P. P., Richter V. A., Schweigert I. V., Zakrevsky D. E., Koval O. A. (2019). Cold Physical Plasma Decreases the Viability of Lung Adenocarcinoma Cells. *Acta Naturae*, 11(3), 16–19.
3. Zakrevsky D., Yelak E., Gugin P., **Golubitskaya E. (Patrakova E.)**, Troitzkaja O., Koval O., Vagapov S., Schweigert I. (2019). Interaction of cold atmospheric plasma jet with bio targets: different sensitivities of human cell lines. *Journal of Physics: Conference Series*, 1393(1), 012153.
4. Schweigert I., Alexandrov A., Zakrevsky D., Gugin P., Milakhina E., **Golubitskaya E. (Patrakova E.)**, Troitskaya, O., Biryukov, M., Koval, O. (2020). Analysis of Grounded Substrate Effects on Cold Atmospheric Plasma Jet Irradiation of Cellular and Animal models. *Journal of Physics: Conference Series*, 1698(1), 012010.
5. P. P. Gugin, D. É. Zakrevskii, E. V. Milakhina, M. M. Biryukov, O. A. Koval, **E. A. Patrakova**, and I. V. Shveigert Optimization of the Parameters of a Cold Plasma Jet Produced by Sinusoidal Voltage Excitation for Effective Suppression of Cancer Cell Viability (2023) *Biomedical Engineering*, 56 (6), 409–413.
6. **Е. А. Патракова**, М. М. Бирюков, О. С. Троицкая, Д. Д. Новак, Е. В. Милахина, П. П. Гугин, Д. Э. Закревский, И. В. Швейгерт, О. А. Коваль ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АТМОСФЕРНОЙ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЕННОЙ СТРУИ В ОТНОШЕНИИ 3D-КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА (2023) *Цитология* 65 (1), 398-53.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Haertel B. et al. Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma Possible Application in Wound Healing // *Biomolecules & Therapeutics*. 2014. Vol. 22, № 6. P. 477–490.
2. Yan D., Sherman J.H., Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 9. P. 15977–15995.
3. Weltmann K.-D. et al. Atmospheric Pressure Plasma Jet for Medical Therapy: Plasma Parameters and Risk Estimation // *Contributions to Plasma Physics*. 2009. Vol. 49, № 9. P. 631–640.
4. Setsuhara Y. Low-temperature atmospheric-pressure plasma sources for plasma medicine // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press, 2016. Vol. 605. P. 3–10.
5. Laroussi M., Lu X., Keidar M. Perspective: The physics, diagnostics, and applications of atmospheric pressure low temperature plasma sources used in plasma medicine // *Journal of Applied Physics*. 2017. Vol. 122, № 2. P. 020901.
6. Yan D. et al. Multi-Modal Biological Destruction by Cold Atmospheric Plasma: Capability and Mechanism // *Biomedicines*. 2021. Vol. 9, № 9. P. 1259.
7. Bernhardt T. et al. Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. Vol. 2019. P. 1–10.
8. Daeschlein G. et al. Skin and wound decontamination of multidrug-resistant bacteria by cold atmospheric plasma coagulation // *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2015. Vol. 13, № 2. P. 143–149.
9. Keidar M. Plasma for cancer treatment // *Plasma Sources Science and Technology*. 2015. Vol. 24, № 3. P. 033001.
10. Harley J.C., Suchowerska N., McKenzie D.R. Cancer treatment with gas plasma and with gas plasma-activated liquid: positives, potentials and problems of clinical translation // *Biophysical Reviews*. 2020. Vol. 12, № 4. P. 989–1006.
11. Privat-Maldonado A. et al. Modifying the Tumour Microenvironment: Challenges and Future Perspectives for Anticancer Plasma Treatments // *Cancers (Basel)*. 2019. Vol. 11, № 12. P. 1920.
12. Kong M.G. et al. Plasma medicine: an introductory review // *New Journal of Physics*. 2009. Vol. 11, № 11. P. 115012.
13. Kaushik N.K. et al. Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions // *Biological Chemistry*. 2018. Vol. 400, № 1. P. 39–62.

14. Song K., Li G., Ma Y. A Review on the Selective Apoptotic Effect of Nonthermal Atmospheric-Pressure Plasma on Cancer Cells // *Plasma Medicine*. 2014. Vol. 4, № 1–4. P. 193–209.
15. Lu X. et al. Reactive species in non-equilibrium atmospheric-pressure plasmas: Generation, transport, and biological effects // *Physics Reports*. North-Holland, 2016. Vol. 630. P. 1–84.
16. Giles G.I. et al. antioxidants The Reactive Sulfur Species Concept: 15 Years On // *Antioxidants*. 2017. Vol. 6. P. 38.
17. Mishanina T. v, Libiad M., Banerjee R. Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways // *Nature Chemical Biology*. 2015.
18. Klinkhammer C. et al. Elucidation of Plasma-induced Chemical Modifications on Glutathione and Glutathione Disulphide // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, № 1. P. 13828.
19. Lackmann J.-W. et al. Chemical fingerprints of cold physical plasmas – an experimental and computational study using cysteine as tracer compound // *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 7736.
20. Gray M.J., Wholey W.-Y., Jakob U. Bacterial Responses to Reactive Chlorine Species. 2013.
21. Liu Z.C. et al. Chemical Kinetics and Reactive Species in Normal Saline Activated by a Surface Air Discharge; Chemical Kinetics and Reactive Species in Normal Saline Activated by a Surface Air Discharge.
22. Locke B.R. et al. Analysis and Review of Chemical Reactions and Transport Processes in Pulsed Electrical Discharge Plasma Formed Directly in Liquid Water Introduction and Scope // *Plasma Chem Plasma Process*. 2012. Vol. 32. P. 875–917.
23. Bruggeman P.J. et al. Plasma–liquid interactions: a review and roadmap // *Plasma Sources Science and Technology*. 2016. Vol. 25, № 5. P. 053002.
24. Samukawa S. et al. The 2012 Plasma Roadmap // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2012. Vol. 45, № 25. P. 253001.
25. Sander R. Compilation of Henry’s law constants (version 4.0) for water as solvent // *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2015. Vol. 15, № 8. P. 4399–4981.
26. Winterbourn C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species // *Nature Chemical Biology*. 2008. Vol. 4, № 5. P. 278–286.
27. Gaetani G. et al. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes // *Blood*. 1989. Vol. 73, № 1. P. 334–339.

28. Antunes F., Cadenas E. Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes.
29. Gorbanev Y., O'Connell D., Chechik V. Non-Thermal Plasma in Contact with Water: The Origin of Species // *Chemistry - A European Journal*. 2016. Vol. 22, № 10. P. 3496–3505.
30. Winter J. et al. Feed gas humidity: a vital parameter affecting a cold atmospheric-pressure plasma jet and plasma-treated human skin cells // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2013. Vol. 46, № 29. P. 295401.
31. Schmidt-Bleker A. et al. On the plasma chemistry of a cold atmospheric argon plasma jet with shielding gas device // *Plasma Sources Science and Technology*. 2016. Vol. 25, № 1. P. 015005.
32. Schmidt-Bleker A. et al. How to produce an NO_x - instead of O_x -based chemistry with a cold atmospheric plasma jet // *Plasma Processes and Polymers*. 2016. Vol. 13, № 11. P. 1120–1127.
33. Winter J. et al. Tracking plasma generated H₂O₂ from gas into liquid phase and revealing its dominant impact on human skin cells // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2014. Vol. 47, № 28. P. 285401.
34. Ju Y., Sun W. Plasma assisted combustion: Dynamics and chemistry // *Progress in Energy and Combustion Science*. Pergamon, 2015. Vol. 48. P. 21–83.
35. Shukla P.K., Mamun A.A. *Introduction to Dusty Plasma Physics*. CRC Press, 2015.
36. Goldstein S., Czapski G. Mannitol as an OH· Scavenger in Aqueous Solutions and in Biological Systems // *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*. 1984. Vol. 46, № 6. P. 725–729.
37. Ikawa S. et al. Physicochemical properties of bactericidal plasma-treated water // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2016. Vol. 49, № 42. P. 425401.
38. Lukes P. et al. Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: evidence for the formation of peroxyxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H₂O₂ and HNO₂ // *Plasma Sources Science and Technology*. 2014. Vol. 23, № 1. P. 015019.
39. Reuter S. et al. Atomic oxygen in a cold argon plasma jet: TALIF spectroscopy in ambient air with modelling and measurements of ambient species diffusion // *Plasma Sources Science and Technology*. 2012. Vol. 21, № 2. P. 024005.

40. Zhang S. et al. The effect of collisional quenching of the O 3p³ P_J state on the determination of the spatial distribution of the atomic oxygen density in an APPJ operating in ambient air by TALIF // *Plasma Sources Science and Technology*. 2014. Vol. 23, № 2. P. 025012.
41. Bekeschus S. et al. Oxygen atoms are critical in rendering THP-1 leukaemia cells susceptible to cold physical plasma-induced apoptosis // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, № 1. P. 2791.
42. Maheux S. et al. Small unilamellar liposomes as a membrane model for cell inactivation by cold atmospheric plasma treatment // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2016. Vol. 49, № 34. P. 344001.
43. Wende K. et al. Identification of the biologically active liquid chemistry induced by a nonthermal atmospheric pressure plasma jet // *Biointerphases*. 2015. Vol. 10, № 2. P. 029518.
44. Takai E. et al. Chemical modification of amino acids by atmospheric-pressure cold plasma in aqueous solution // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2014. Vol. 47, № 28. P. 285403.
45. Lozano-Juste J., Colom-Moreno R., León J. In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana* // *Journal of Experimental Botany*. 2011. Vol. 62, № 10. P. 3501–3517.
46. Radi R. Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of Functional Effects // *Accounts of Chemical Research*. 2013. Vol. 46, № 2. P. 550–559.
47. Wende K. et al. Chemistry and biochemistry of cold physical plasma derived reactive species in liquids // *Biological Chemistry*. 2018. Vol. 400, № 1. P. 19–38.
48. Bekeschus S. et al. Hydrogen peroxide: A central player in physical plasma-induced oxidative stress in human blood cells // *Free Radical Research*. 2014. Vol. 48, № 5. P. 542–549.
49. MALLIS R.J., BUSS J.E., THOMAS J.A. Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosylation of reactive cysteines // *Biochemical Journal*. 2001. Vol. 355, № 1. P. 145–153.
50. Verlackt C.C.W. et al. Mechanisms of Peptide Oxidation by Hydroxyl Radicals: Insight at the Molecular Scale // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2017. Vol. 121, № 10. P. 5787–5799.
51. Takai E. et al. Protein Inactivation by Low-temperature Atmospheric Pressure Plasma in Aqueous Solution // *Plasma Processes and Polymers*. 2012. Vol. 9, № 1. P. 77–82.
52. Ke Z., Huang Q. Inactivation and Heme Degradation of Horseradish Peroxidase Induced by Discharge Plasma // *Plasma Processes and Polymers*. 2013. Vol. 10, № 8. P. 731–739.
53. Attri P. et al. Influence of reactive species on the modification of biomolecules generated from the soft plasma // *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5, № 1. P. 8221.

54. Li H.-P. et al. Manipulation of Lipase Activity by the Helium Radio-Frequency, Atmospheric-Pressure Glow Discharge Plasma Jet // *Plasma Processes and Polymers*. 2011. Vol. 8, № 3. P. 224–229.
55. Lackmann J.-W. et al. Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically // *Journal of The Royal Society Interface*. 2013. Vol. 10, № 89. P. 20130591.
56. Lackmann J.-W. et al. A dielectric barrier discharge terminally inactivates RNase A by oxidizing sulfur-containing amino acids and breaking structural disulfide bonds // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2015. Vol. 48, № 49. P. 494003.
57. Aboubakr H.A. et al. Cold argon-oxygen plasma species oxidize and disintegrate capsid protein of feline calicivirus // *PLOS ONE*. 2018. Vol. 13, № 3. P. e0194618.
58. Bishop J.R., Schuksz M., Esko J.D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology // *Nature*. 2007. Vol. 446, № 7139. P. 1030–1037.
59. Lin X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development // *Development*. 2004. Vol. 131, № 24. P. 6009–6021.
60. Reitsma S. et al. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization // *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2007. Vol. 454, № 3. P. 345–359.
61. Benoit M. et al. Depolymerization of Cellulose Assisted by a Nonthermal Atmospheric Plasma // *Angewandte Chemie*. 2011. Vol. 123, № 38. P. 9126–9129.
62. Thirumdas R., Kadam D., Annapure U.S. Cold Plasma: an Alternative Technology for the Starch Modification // *Food Biophysics*. 2017. Vol. 12, № 1. P. 129–139.
63. Almeida F.D.L. et al. Fructooligosaccharides integrity after atmospheric cold plasma and high-pressure processing of a functional orange juice // *Food Research International*. 2017. Vol. 102. P. 282–290.
64. Han X., Yang K., Gross R.W. Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses // *Mass Spectrometry Reviews*. 2012. Vol. 31, № 1. P. 134–178.
65. Ni Z., Milic I., Fedorova M. Identification of carbonylated lipids from different phospholipid classes by shotgun and LC-MS lipidomics // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015. Vol. 407, № 17. P. 5161–5173.

66. Carr A.C. et al. Modification of red cell membrane lipids by hypochlorous acid and haemolysis by preformed lipid chlorohydrins // *Redox Report*. 1997. Vol. 3, № 5–6. P. 263–271.
67. Yusupov M. et al. Effect of head group and lipid tail oxidation in the cell membrane revealed through integrated simulations and experiments // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, № 1. P. 5761.
68. Sasaki S. et al. Characterization of plasma-induced cell membrane permeabilization: focus on OH radical distribution // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2016. Vol. 49, № 33. P. 334002.
69. Yusupov M. et al. Synergistic effect of electric field and lipid oxidation on the permeability of cell membranes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. Elsevier, 2017. Vol. 1861, № 4. P. 839–847.
70. Suda Y. et al. Reduction in lateral lipid mobility of lipid bilayer membrane by atmospheric pressure plasma irradiation // *Japanese Journal of Applied Physics*. 2016. Vol. 55, № 3S2. P. 03DF05.
71. Surowsky B., Bußler S., Schlüter O.K. Cold Plasma Interactions With Food Constituents in Liquid and Solid Food Matrices // *Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications*. Academic Press, 2016. P. 179–203.
72. Boehm D. et al. Cytotoxic and mutagenic potential of solutions exposed to cold atmospheric plasma OPEN // *Nature Publishing Group*. 2016.
73. Wende K. et al. Risk assessment of a cold argon plasma jet in respect to its mutagenicity // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. Elsevier, 2016. Vol. 798–799. P. 48–54.
74. Leduc M. et al. Effects of Non-thermal Plasmas on DNA and Mammalian Cells // *Plasma Processes and Polymers*. 2010. Vol. 7, № 11. P. 899–909.
75. Braný D. et al. Effect of Cold Atmospheric Plasma on Epigenetic Changes, DNA Damage, and Possibilities for Its Use in Synergistic Cancer Therapy // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, № 22. P. 12252.
76. Arjunan K.P., Sharma V.K., Ptasinska S. Effects of Atmospheric Pressure Plasmas on Isolated and Cellular DNA-A Review // *OPEN ACCESS Int. J. Mol. Sci*. 2015. Vol. 16. P. 16.
77. Vaquero J. et al. Cold-Atmospheric Plasma Induces Tumor Cell Death in Preclinical In Vivo and In Vitro Models of Human Cholangiocarcinoma // *Cancers (Basel)*. 2020. Vol. 12, № 5. P. 1280.
78. Judée F. et al. Short and long time effects of low temperature Plasma Activated Media on 3D multicellular tumor spheroids // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6, № 1. P. 21421.

79. Hirst A.M. et al. Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells // *British Journal of Cancer*. 2015. Vol. 112, № 9. P. 1536–1545.
80. BAUER G. The Antitumor Effect of Singlet Oxygen // *Anticancer Research*. 2016. Vol. 36, № 11. P. 5649–5664.
81. Bauer G. The synergistic effect between hydrogen peroxide and nitrite, two long-lived molecular species from cold atmospheric plasma, triggers tumor cells to induce their own cell death // *Redox Biology*. 2019. Vol. 26. P. 101291.
82. Bauer G. Targeting Protective Catalase of Tumor Cells with Cold Atmospheric Plasma- Activated Medium (PAM) // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 18, № 6. P. 784–804.
83. Yan D. et al. The Strong Cell-based Hydrogen Peroxide Generation Triggered by Cold Atmospheric Plasma // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, № 1. P. 10831.
84. Bauer G. et al. Dynamics of Singlet Oxygen-Triggered, RONS-Based Apoptosis Induction after Treatment of Tumor Cells with Cold Atmospheric Plasma or Plasma-Activated Medium // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 13931.
85. Bauer G. et al. Cold Atmospheric Plasma and Plasma-Activated Medium Trigger RONS-Based Tumor Cell Apoptosis // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 14210.
86. Alimohammadi M. et al. Cold Atmospheric Plasma Is a Potent Tool to Improve Chemotherapy in Melanoma In Vitro and In Vivo // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10, № 7. P. 1011.
87. Shaw P. et al. Synergistic Effects of Melittin and Plasma Treatment: A Promising Approach for Cancer Therapy // *Cancers (Basel)*. 2019. Vol. 11, № 8. P. 1109.
88. Vijayarangan V. et al. New insights on molecular internalization and drug delivery following plasma jet exposures // *International Journal of Pharmaceutics*. 2020. Vol. 589. P. 119874.
89. Haralambiev L. et al. Cold Atmospheric Plasma Treatment of Chondrosarcoma Cells Affects Proliferation and Cell Membrane Permeability // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, № 7. P. 2291.
90. HARALAMBIEV L. et al. The Effect of Cold Atmospheric Plasma on the Membrane Permeability of Human Osteosarcoma Cells // *Anticancer Research*. 2020. Vol. 40, № 2. P. 841–846.

91. He Z. et al. Cold Atmospheric Plasma Stimulates Clathrin-Dependent Endocytosis to Repair Oxidised Membrane and Enhance Uptake of Nanomaterial in Glioblastoma Multiforme Cells // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 6985.
92. He Z. et al. Cold Atmospheric Plasma Induces ATP-Dependent Endocytosis of Nanoparticles and Synergistic U373MG Cancer Cell Death // *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 5298.
93. Yan D. et al. Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma—A model based on aquaporins (Review) // *Biointerphases*. 2015. Vol. 10, № 4. P. 040801.
94. Schneider C. et al. Acidification is an Essential Process of Cold Atmospheric Plasma and Promotes the Anti-Cancer Effect on Malignant Melanoma Cells // *Cancers (Basel)*. 2019. Vol. 11, № 5. P. 671.
95. Schneider C. et al. Cold atmospheric plasma causes a calcium influx in melanoma cells triggering CAP-induced senescence // *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 10048.
96. Xu S. et al. Cold atmospheric plasma-activated Ringer's solution inhibits the proliferation of osteosarcoma cells through the mitochondrial apoptosis pathway // *Oncology Reports*. 2020.
97. Murakami T. Numerical modelling of the effects of cold atmospheric plasma on mitochondrial redox homeostasis and energy metabolism // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 17138.
98. Moniruzzaman R. et al. Roles of intracellular and extracellular ROS formation in apoptosis induced by cold atmospheric helium plasma and X-irradiation in the presence of sulfasalazine // *Free Radical Biology and Medicine*. 2018. Vol. 129. P. 537–547.
99. Adhikari M. et al. Cold Atmospheric Plasma and Silymarin Nanoemulsion Activate Autophagy in Human Melanoma Cells // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, № 6. P. 1939.
100. Scharf C. et al. Improved Wound Healing of Airway Epithelial Cells Is Mediated by Cold Atmospheric Plasma: A Time Course-Related Proteome Analysis // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. Vol. 2019. P. 1–21.
101. Arndt S. et al. Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells // *Experimental Dermatology*. 2013. Vol. 22, № 4. P. 284–289.
102. Schmidt A. et al. Cold Physical Plasma Modulates p53 and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Keratinocytes // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. Vol. 2019. P. 1–16.

103. Shi L. et al. Gene expression profiling and functional analysis reveals that p53 pathway-related gene expression is highly activated in cancer cells treated by cold atmospheric plasma-activated medium // *PeerJ*. 2017. Vol. 5. P. e3751.
104. Ji H.W. et al. Genome-Wide Comparison of the Target Genes of the Reactive Oxygen Species and Non-Reactive Oxygen Species Constituents of Cold Atmospheric Plasma in Cancer Cells // *Cancers (Basel)*. 2020. Vol. 12, № 9. P. 2640.
105. Yang F. et al. Combination of metformin and cold atmospheric plasma induces glioma cell death to associate with c-Fos // *Neoplasma*. 2021. Vol. 68, № 01. P. 126–134.
106. Tanaka H. et al. Oxidative stress-dependent and -independent death of glioblastoma cells induced by non-thermal plasma-exposed solutions // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 13657.
107. Yang Y. et al.

Low-Temperature Plasma Suppresses Proliferation and Induces Apoptosis in Lung Cancer Cells by Regulating the miR-203a/BIRC5 Axis

 // *OncoTargets and Therapy*. 2020. Vol. Volume 13. P. 5145–5153.
108. Lee S. et al. ChIP-seq analysis reveals alteration of H3K4 trimethylation occupancy in cancer-related genes by cold atmospheric plasma // *Free Radical Biology and Medicine*. 2018. Vol. 126. P. 133–141.
109. Park S.-B. et al. Differential Epigenetic Effects of Atmospheric Cold Plasma on MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells // *PLOS ONE*. 2015. Vol. 10, № 6. P. e0129931.
110. Tornin J. et al. Pyruvate Plays a Main Role in the Antitumoral Selectivity of Cold Atmospheric Plasma in Osteosarcoma // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 10681.
111. Xu D. et al. Effect of cold atmospheric plasma treatment on the metabolites of human leukemia cells // *Cancer Cell International*. 2019. Vol. 19, № 1. P. 135.
112. Yang Y. et al. Analysis of Metabolite Profiling in Human Endothelial Cells after Plasma Jet Treatment // *BioMed Research International*. 2019. Vol. 2019. P. 1–9.
113. Xu D. et al. Alteration of metabolite profiling by cold atmospheric plasma treatment in human myeloma cells // *Cancer Cell International*. 2018. Vol. 18, № 1. P. 42.
114. Ishikawa K. et al. Non-thermal plasma-activated lactate solution kills U251SP glioblastoma cells in an innate reductive manner with altered metabolism // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2020. Vol. 688. P. 108414.

115. Motaln H., Recek N., Rogelj B. Intracellular Responses Triggered by Cold Atmospheric Plasma and Plasma-Activated Media in Cancer Cells // *Molecules*. 2021. Vol. 26, № 5. P. 1336.
116. HARALAMBIEV L. et al. Determination of Immediate vs. Kinetic Growth Retardation in Physically Plasma-treated Cells by Experimental and Modelling Data // *Anticancer Research*. 2020. Vol. 40, № 7. P. 3743–3749.
117. Nakai N. et al. Retardation of C2C12 myoblast cell proliferation by exposure to low-temperature atmospheric plasma // *The Journal of Physiological Sciences*. 2014. Vol. 64, № 5. P. 365–375.
118. Volotskova O. et al. Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma // *Scientific Reports*. 2012. Vol. 2, № 1. P. 636.
119. Siu A. et al. Differential Effects of Cold Atmospheric Plasma in the Treatment of Malignant Glioma // *PLOS ONE*. 2015. Vol. 10, № 6. P. e0126313.
120. Wang M. et al. Cold Atmospheric Plasma for Selectively Ablating Metastatic Breast Cancer Cells // *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, № 9. P. e73741.
121. STOPE M.B. et al. Protherapeutic Effects and Inactivation of Mammary Carcinoma Cells by a Medical Argon Plasma Device // *Anticancer Research*. 2020. Vol. 40, № 11. P. 6205–6212.
122. Lee J. et al. Anticancer Effects of Cold Atmospheric Plasma in Canine Osteosarcoma Cells // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, № 12. P. 4556.
123. Adhikari M. et al. Cold atmospheric plasma and silymarin nanoemulsion synergistically inhibits human melanoma tumorigenesis via targeting HGF/c-MET downstream pathway // *Cell Communication and Signaling*. 2019. Vol. 17, № 1. P. 52.
124. Tornín J. et al. Osteosarcoma tissue-engineered model challenges oxidative stress therapy revealing promoted cancer stem cell properties // *Free Radical Biology and Medicine*. 2021. Vol. 164. P. 107–118.
125. Gjika E. et al. Combination therapy of cold atmospheric plasma (CAP) with temozolomide in the treatment of U87MG glioblastoma cells // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 16495.
126. Xu D. et al. The effects of cold atmospheric plasma on cell adhesion, differentiation, migration, apoptosis and drug sensitivity of multiple myeloma // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016. Vol. 473, № 4. P. 1125–1132.

127. Chang C.-H., Yano K., Sato T. Nanosecond pulsed current under plasma-producing conditions induces morphological alterations and stress fiber formation in human fibrosarcoma HT-1080 cells // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2020. Vol. 681. P. 108252.
128. Duchesne C. et al. Cold atmospheric plasma modulates endothelial nitric oxide synthase signalling and enhances burn wound neovascularisation // *The Journal of Pathology*. 2019. Vol. 249, № 3. P. 368–380.
129. Yoshikawa N. et al. Plasma-activated medium promotes autophagic cell death along with alteration of the mTOR pathway // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 1614.
130. Bourdens M. et al. Short exposure to cold atmospheric plasma induces senescence in human skin fibroblasts and adipose mesenchymal stromal cells // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 8671.
131. Thiyagarajan M., Anderson H., Gonzales X.F. Induction of apoptosis in human myeloid leukemia cells by remote exposure of resistive barrier cold plasma // *Biotechnology and Bioengineering*. 2014. Vol. 111, № 3. P. 565–574.
132. TABUCHI Y. et al. Effects of nitrogen on the apoptosis of and changes in gene expression in human lymphoma U937 cells exposed to argon-based cold atmospheric pressure plasma // *International Journal of Molecular Medicine*. 2016. Vol. 37, № 6. P. 1706–1714.
133. Xiang L. et al. Cold atmospheric plasma conveys selectivity on triple negative breast cancer cells both in vitro and in vivo // *Free Radical Biology and Medicine*. 2018. Vol. 124. P. 205–213.
134. Yang X. et al. Inhibition of basal cell carcinoma cells by cold atmospheric plasma-activated solution and differential gene expression analysis // *International Journal of Oncology*. 2020.
135. Xia J. et al. Cold atmospheric plasma induces apoptosis of melanoma cells via Sestrin2-mediated nitric oxide synthase signaling // *Journal of Biophotonics*. 2019. Vol. 12, № 1. P. e201800046.
136. Xu D. et al. Cold atmospheric plasma as a potential tool for multiple myeloma treatment // *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, № 26. P. 18002–18017.
137. Turrini E. et al. Cold Atmospheric Plasma Induces Apoptosis and Oxidative Stress Pathway Regulation in T-Lymphoblastoid Leukemia Cells // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017. Vol. 2017. P. 1–13.

138. Weiss M. et al. Cold Atmospheric Plasma Treatment Induces Anti-Proliferative Effects in Prostate Cancer Cells by Redox and Apoptotic Signaling Pathways // PLOS ONE. 2015. Vol. 10, № 7. P. e0130350.
139. Gümbel D. et al. New Treatment Options for Osteosarcoma - Inactivation of Osteosarcoma Cells by Cold Atmospheric Plasma. // Anticancer Res. 2016. Vol. 36, № 11. P. 5915–5922.
140. Schneider C. et al. Cold atmospheric plasma treatment inhibits growth in colorectal cancer cells // Biological Chemistry. 2018. Vol. 400, № 1. P. 111–122.
141. Kurita H. et al. Strand breaks and chemical modification of intracellular DNA induced by cold atmospheric pressure plasma irradiation // PLOS ONE. 2020. Vol. 15, № 5. P. e0232724.
142. Weiss M. et al. Inhibition of Cell Growth of the Prostate Cancer Cell Model LNCaP by Cold Atmospheric Plasma. // In Vivo. Vol. 29, № 5. P. 611–616.
143. Haralambiev L. et al. Inhibition of Angiogenesis by Treatment with Cold Atmospheric Plasma as a Promising Therapeutic Approach in Oncology // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21, № 19. P. 7098.
144. Yadav D.K. et al. Cold atmospheric plasma generated reactive species aided inhibitory effects on human melanoma cells: an in vitro and in silico study // Scientific Reports. 2020. Vol. 10, № 1. P. 3396.
145. Yoon Y.J. et al. Anti-tumor effects of cold atmospheric pressure plasma on vestibular schwannoma demonstrate its feasibility as an intra-operative adjuvant treatment // Free Radical Biology and Medicine. 2018. Vol. 115. P. 43–56.
146. Kroemer G. et al. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy // Annual Review of Immunology. 2013. Vol. 31, № 1. P. 51–72.
147. Alzeibak R. et al. Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future // Journal for ImmunoTherapy of Cancer. 2021. Vol. 9, № 1. P. e001926.
148. Azzariti A. et al. Plasma-activated medium triggers cell death and the presentation of immune activating danger signals in melanoma and pancreatic cancer cells // Scientific Reports. 2019. Vol. 9, № 1. P. 4099.
149. YOON Y. et al. Cold Atmospheric Plasma Induces HMGB1 Expression in Cancer Cells // Anticancer Research. 2019. Vol. 39, № 5. P. 2405–2413.

150. van Loenhout J. et al. Cold Atmospheric Plasma-Treated PBS Eliminates Immunosuppressive Pancreatic Stellate Cells and Induces Immunogenic Cell Death of Pancreatic Cancer Cells // *Cancers (Basel)*. 2019. Vol. 11, № 10. P. 1597.
151. Laroussi M. Plasma Medicine: A Brief Introduction // *Plasma*. 2018. Vol. 1, № 1. P. 47–60.
152. Attri P. et al. Plasma Agriculture from Laboratory to Farm: A Review // *Processes*. 2020. Vol. 8, № 8. P. 1002.
153. Gavahian M., Khaneghah A.M. Cold plasma as a tool for the elimination of food contaminants: Recent advances and future trends // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020. Vol. 60, № 9. P. 1581–1592.
154. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method // *Methods*. 2001. Vol. 25, № 4. P. 402–408.
155. Schweigert I. v, Alexandrov A.L., Zakrevsky D.E. Self-organization of touching-target current with ac voltage in atmospheric pressure plasma jet for medical application parameters // *Plasma Sources Science and Technology*. 2020. Vol. 29, № 12. P. 12LT02.
156. Bienert G.P., Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2014. Vol. 1840, № 5. P. 1596–1604.
157. Yan D. et al. Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma—A model based on aquaporins (Review) // *Biointerphases*. 2015. Vol. 10, № 4. P. 040801.