

УДК 577.24:612.014.462.4

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ АТМОСФЕРНОЙ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ HeLa И ЕГО ИЗМЕНЕНИЕ В ПРИСУТСТВИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

© 2019 г. А.Г. Аюпджанов*, Н.Л. Шимановский*, Д.С. Степанова*, Т.А. Федотчева*, А.В. Пулиш*, Н.Г. Гусейн-заде* **, Л.В. Колик* **, Е.М. Конечков* **

*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

**Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 38

E-mail: artura777@mail.ru

Поступила в редакцию 23.07.2019 г.

После доработки 23.08.2019 г.

Принята к публикации 29.08.2019 г.

Показано, что низкотемпературная неравновесная плазма прямого пьезоразряда оказывает дозозависимое цитотоксическое действие на культуру опухолевых клеток HeLa. Противоопухолевый антибиотик доксорубин увеличивал данный эффект холодной плазмы, а антиоксидант дигидрокверцетин — ослаблял.

Ключевые слова: холодная плазма, цитотоксичность, опухолевые клетки, апоптоз, доксорубин.

DOI: 10.1134/S0006302919060127

В последние годы в ряде исследований показаны возможности применения низкотемпературной плазмы при атмосферном давлении в биологии и медицине для стерилизации различных поверхностей и живых тканей, регуляции коагуляции крови, стимуляции заживления тканей и пролиферации клеток [1]. Особый интерес представляют возможности применения холодной плазмы в онкологии [2].

Согласно литературным данным [3], преимуществом плазменных технологий в онкологии может являться их способность к дифференцированному воздействию на здоровые и опухолевые клетки. Большинство исследователей связывают механизм цитотоксических эффектов плазменного облучения с генерацией активных форм кислорода и активных форм азота, в частности H_2O_2 и NO^\bullet [4,5]. Так как существуют различные лекарственные соединения, влияющие на образование радикалов, представляет интерес изучить действие таких веществ на цитотоксическую активность холодной плазмы. Для этого в данной работе мы оценили комбинированное цитотоксическое действие холодной плазмы, противоопухолевого средства доксорубина (индуктора образования радикалов в процессе его метаболизма) [6] и флавоноида дигидрокверцетина, обладающего антиоксидантными и антирадикальными свойствами [7], на культуру опухолевых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Воздействие на культуры клеток проводили с помощью лабораторного источника низкотемпературной плазмы на основе прямого пьезоразряда, получаемого с помощью пьезотрансформатора ТП-Р1 (ИОФ РАН, Москва). Этот источник создавал в воздухе короткие плазменные каналы (10–100 нс) с частотой, приблизительно соответствующей двойной резонансной частоте пьезотрансформатора (~40 кГц). Оптимальные значения КПД и выходной мощности достигались при работе на резонансной частоте пьезотрансформатора или ее гармониках. Потребляемая мощность прибора не превышает 10 Вт при энерговыделении в обрабатываемую среду 75 Дж/мин. Спектр излучения прямого пьезоразряда в воздухе при атмосферном давлении, представлен на рис. 1.

Для экспериментов по облучению клетки высевали на шестиугольные планшеты в концентрации 200 тыс. клеток на лунку. Общая доза воздействия плазмы регулировалась временем облучения в интервале от 30 до 300 с.

Жизнеспособность клеток до и после облучения оценивали с помощью МТТ-теста [8]. Клетки рака шейки матки человека HeLa культивировали с использованием среды для культивирования RPMI (Sigma-Aldrich, США) со стабильным глутамином GlutaMax и добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки во флаконах T75 с

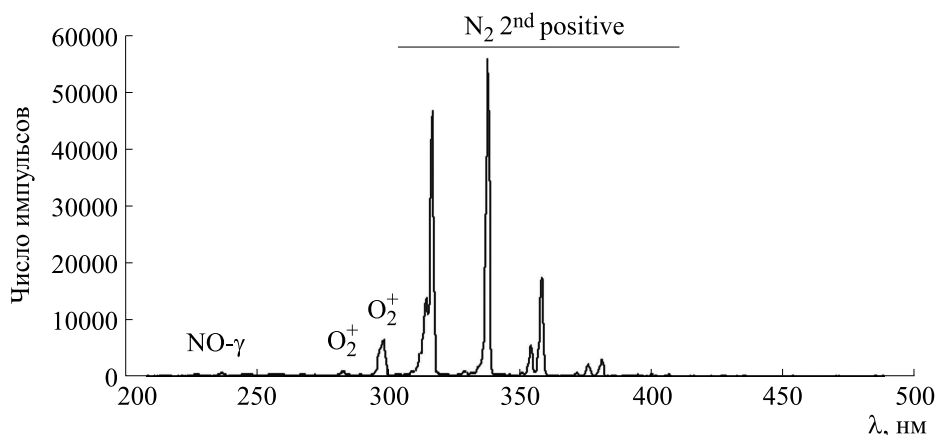


Рис. 1. Спектр излучения прямого пьезоразряда в воздухе при атмосферном давлении в диапазоне 200–500 нм.

культуральным покрытием и вентилируемой крышкой при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Статистическую обработку результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $P \leq 0,05$.

В качестве фармакологических веществ использовали доксорубин («Тева», Израиль) и дигидрохверцетин («Биотехпром», Россия). Концентрация доксорубина составляла 0,3 мкмоль/л [9], а концентрация дигидрохверцетина — 0,1 мкмоль/л [7], что соответствует их концентрациям, при которых наблюдается антипролиферативное и антиоксидантное действие соответственно.

Оценку количества образовавшихся радикалов после воздействия холодной плазмы проводили с помощью метода стимулированной хемилюминисценции. В качестве активатора свечения использовали люминол в стандартной концентрации (0,177 г/мл). В качестве контрольного образца использовали соответствующие необлученные растворы, а количество радикалов оценивали по отношению интенсивности хемилюминисценции исследуемой пробы к интенсивности хемилюминисценции контрольной пробы. Измерение интенсивности хемилюминисценции проводили на биохемилюминесцентном анализаторе «Lum-100» (ООО «ДИСофт», Москва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования цитотоксического действия холодной плазмы на линию клеток HeLa при различных дозах воздействия и временах инкубации представлены на рис. 2а и 3а. В качестве контроля служили клетки, не облученные в ходе экспериментов. Обнаружено, что существует дозовая зависимость подавления холодной плазмой жизнеспособности культуры клеток

HeLa с пороговым значением дозы, соответствующей времени облучения 30 с.

Так как увеличение времени инкубации с 24 до 48 ч практически не влияло на цитотоксичность холодной плазмы, можно считать, что это действие сохраняется и пролиферация клеток со временем не восстанавливается.

Как и ожидалось, добавление к среде инкубации клеток индуктора образования радикалов доксорубина повышает (рис. 2б и 3б), а ингибитора их образования дигидрохверцетина — уменьшает цитотоксичность холодной плазмы (таблица). Дигидрохверцетин добавляли в инкубационную среду клеточной культуры как до, так и после облучения.

Эти результаты подтверждают существующие представления об основной роли радикалов в антипролиферативном действии холодной плазмы на опухолевые клетки и показывают возможность его усиления при сочетанном действии с противоопухолевым препаратом доксорубином.

Совместный цитотоксический эффект доксорубина и холодной плазмы возрастал с увеличением дозы воздействия. Этот результат, возможно, связан с тем, что при метаболизме доксорубина вырабатываются свободные радикалы кислорода, повреждающие ДНК и нарушающие биосинтетические процессы в клетках [6,10].

Относительно высокая чувствительность опухолевых клеток к активным формам кислорода обусловлена метаболическими различиями по сравнению с нормальными клетками. Уровни активных форм кислорода в раковых клетках выше, в связи с чем воздействие плазмы активирует апоптоз в опухолевых клетках интенсивнее, чем в здоровых [4,11]. Влияние свободных радикалов на пролиферацию опухолевых клеток носит дозозависимый характер [4].

Исследования, проведенные методом хемилюминисценции с применением люминола, в кото-

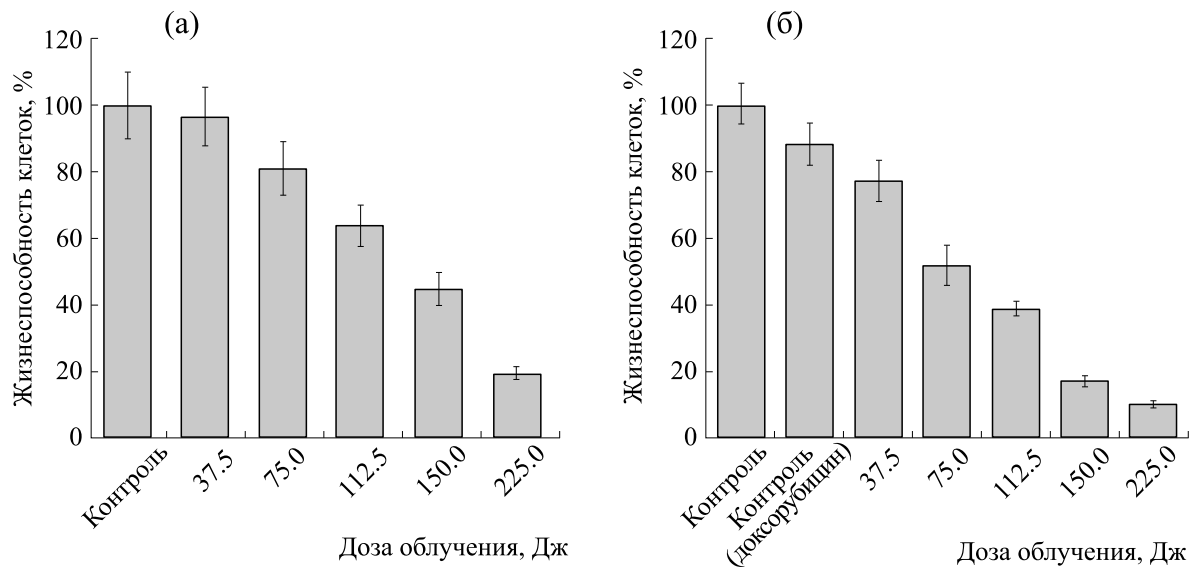


Рис. 2. Жизнеспособность клеток линии HeLa (в %) в зависимости от дозы воздействия холодной плазмой в отсутствие (а) и в присутствии (б) доксорубина. Время инкубации 24 ч, число экспериментов $n = 6$.

ром интенсивность зарегистрированной вспышки пропорциональна количеству свободных радикалов в исследуемом растворе доксорубина, показали увеличение амплитуды сигнала при воздействии холодной плазмы более чем в 10 раз при дозе облучения 75 Дж.

Очевидным преимуществом применения плазменных технологий в онкологии является возможность локального воздействия на новообразование и относительно низкая дозовая нагрузка, что позволит существенно снизить побочное действие холодной плазмы на здоровые ткани. В то же время локальность воздействия сочетается с

относительно невысокой проникающей способностью плазмы, что указывает на перспективность применения ее в дерматологии, в том числе при терапии меланомы. Существуют возможности как непосредственного воздействия на новообразования, так и опосредованное воздействие с помощью плазменно-активированной жидкой среды (PALM – plasma activated liquid media) [12]. Применение методик совместного воздействия плазменного облучения и противоопухолевого препарата может повысить избирательность химиотерапии и существенно снизить системные побочные эффекты как химиотерапевтического

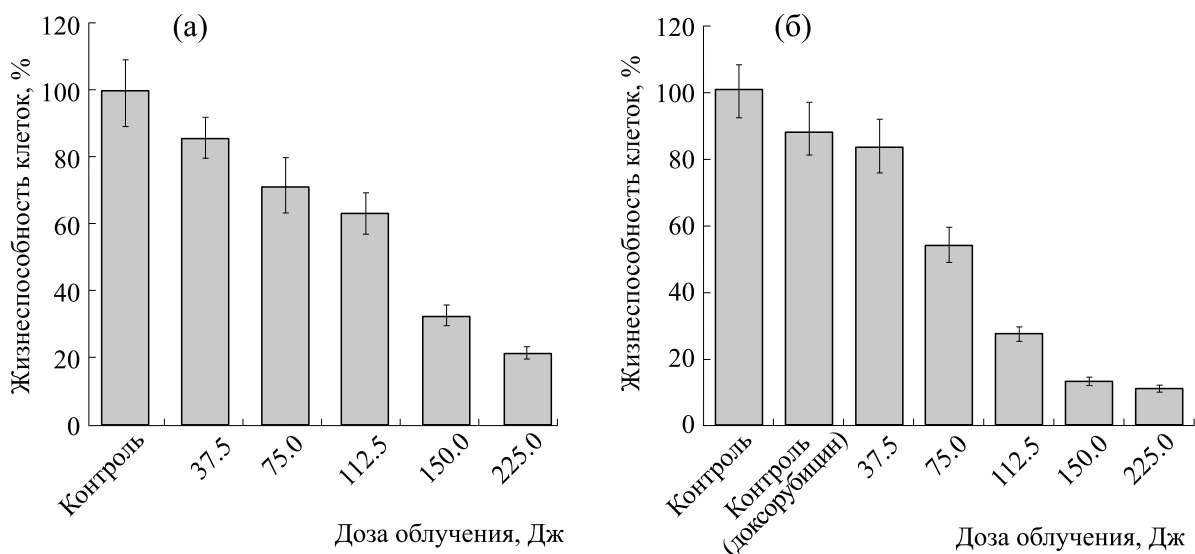


Рис. 3. Жизнеспособность клеток линии HeLa (в %) в зависимости от дозы воздействия холодной плазмой в отсутствие (а) и в присутствии (б) доксорубина. Время инкубации 48 ч, число экспериментов $n = 6$.

Жизнеспособность клеточной линии HeLa в зависимости от дозы воздействия холодной плазмой при добавлении дигидрохверцетина и последующей инкубации клеток в течение 48 ч

Доза облучения, Дж	0	75	112,5	150	225	300
Облучение	100	93,28 ± 8,52	80,74 ± 8,07*	67,37 ± 6,31*	20,16 ± 2,17*	12,26 ± 1,31*
Облучение + + дигидрохверцетин, 0,1 мкМоль/л	94,08 ± 9,21	94,33 ± 9,53	94,81 ± 9,41	91,39 ± 9,21	89,41 ± 8,99*	61,98 ± 6,19*
Дигидрохверцетин, 0,1 мкМоль/л + + облучение	94,08 ± 9,21	94,91 ± 9,49	91,36 ± 9,14	90,36 ± 9,09	81,98 ± 8,18*	60,12 ± 6,01*

Примечание. Результаты приведены в % от контроля (клетки без облучения). * – Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$. Число экспериментов $n = 6$.

препарата, так и самого излучения за счет снижения дозовых нагрузок на организм.

В то же время сочетанное применение антиоксидантов типа дигидрохверцетина уменьшает антипролиферативный эффект холодной плазмы, что следует учитывать при разработке методов практического применения холодной плазмы для лучевой терапии опухолей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-02-00378 А).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Laroussi, Plasma **1** (1), 47 (2018).
2. J. Gay-Mimbrera, M. Carmen, G. Isla-Tejera, et al., Adv. Therapy **33** (6), 894 (2016).
3. F. Saadati, H. Mahdikia, H. Abbaszadeh, et al., Sci. Reports **8**, 7689 (2018).
4. R. A. Cairns, I. Harris, S. McCracken, and T. W. Mak, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **76**, 299 (2011).
5. D. Yan, J. H. Sherman, and M. Keidar, Oncotarget **8**, 15977 (2017).
6. P. D. S. D. Rocha, J. F. Campos, V. Nunes-Souza, et al., Appl. Biochem. Biotechnol. **184** (3), 869 (2018).
7. В. С. Роговский, А. И. Матюшин, Н. Л. Шимановский и др., Эксперим. клинич. фармакология **73** (9), 39 (2010).
8. M. Berridge, P. Herst, and A. Tan, Biotechnol. Annu. Rev. **11**, 127 (2005).
9. А. Г. Акопджанов, Н. Л. Шимановский, В. В. Мингалев и др. Биофизика **59** (5), 902 (2014).
10. А. Г. Акопджанов, Н. Л. Шимановский, Т. А. Федотчева и др. Биофизика **61** (6), 1073 (2016).
11. M. Keidar, R. Walk, A. Shashurin, et al., Br. J. Cancer **105**, 1295 (2011).
12. H. Hara, M. Kobayashi, M. Shiiba, et al., J. Clin. Biochem. **65** (1), 16 (2019).

Cytotoxicity of Cold Atmospheric Plasma against HeLa Cancer Cells and Its Modification in the Presence of Pharmaceutical Substances

A.G. Akopdzhanov*, N.L. Shimanovskii*, D.S. Stepanova*, T.A. Fedotcheva*, A.V. Pulish*, N.G. Gusein-zade* **, L.V. Kolik* **, and E.M. Konchekov* **

*Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

**Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 38, Moscow, 119991 Russia

It was shown that low-temperature non-equilibrium plasma as piezoelectric direct discharge plasma had a dose-dependent cytotoxic effect on the HeLa cell culture. Doxorubicin, an antitumor antibiotic, potentiated the said effect of cold plasma, while dihydroquercetin as an antioxidant weakened it.

Keywords: cold plasma, cytotoxicity, cancer cells, apoptosis, doxorubicin