

УДК 577.33

Воздействие холодной плазменной струи снижает жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого

Е. А. Голубицкая^{1,2#}, О. С. Троицкая^{1#}, Е. В. Елак³, П. П. Гугин⁴, В. А. Рихтер¹,
И. В. Швейгер⁵, Д. Э. Закревский^{3,4}, О. А. Коваль^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

²Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

³Новосибирский государственный технический университет, 630073, Новосибирск, просп. Маркса, 20

⁴Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13

⁵Институт теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН, 630090, Новосибирск, ул. Институтская, 4/1

E-mail: o.koval@niboch.nsc.ru

Равный вклад.

Поступила в редакцию 17.06.2019

Принята к печати 13.09.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-16-19

РЕФЕРАТ Высокая смертность от онкологических заболеваний стимулирует поиск новых путей воздействия на злокачественные новообразования. Среди известных подходов воздействия на опухоли определенными преимуществами обладают электрофизические методы. Представлены результаты изучения влияния холодной плазменной струи (ХПС) на клетки аденокарциномы легкого человека A549 *in vitro*. В исследовании использовано газоразрядное устройство, генерирующее последовательность стримеров, распространяющихся по струе инертного газа в окружающем воздухе. В зоне контакта плазменной струи с объектом воздействия присутствуют значительные электрические поля и высокая концентрация плазмы, при том что температура газа меняется на доли градуса. Проведено сравнение цитотоксического эффекта ХПС в гелии и аргоне. Показано, что прямое облучение клеток ХПС в течение 30–120 с при напряжении 4.2 кВ статистически значимо снижает их жизнеспособность на 25% как при использовании в качестве рабочего инертного газа гелия, так и аргона. Варьирование амплитуды переменного напряжения в плазменном устройстве в диапазоне 3.8–5.6 кВ в аргоне не привело к существенному изменению уровня гибели клеток. Дальнейшая оптимизация режимов генерации ХПС в газоразрядных устройствах различной геометрии с целью воздействия на культуры опухолевых клеток и модельные опухоли на животных может быть основой для развития плазменной противоопухолевой терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аденокарцинома легкого, низкотемпературная атмосферная плазменная струя, противоопухолевая терапия, активные формы кислорода.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид; ХПС – холодная плазменная струя; FBS – эмбриональная сыворотка телят; RNS – активные формы азота; ROS – активные формы кислорода.

ВВЕДЕНИЕ

Для борьбы со злокачественными новообразованиями, наряду с разработкой эффективных противоопухолевых химиопрепаратов, существенное внимание уделяют физическим методам – радиотерапии, в том числе фотонотерапии, протонотерапии и борнейтронзахватной терапии [1, 2]. Одним из новых многообещающих биофизических подходов к терапии

целого ряда злокачественных опухолей является применение холодной плазменной струи (ХПС) [3]. К факторам потенциального риска применения ХПС у человека относят возможность протекания через ткань электрического тока, термическое повреждение и воздействие УФ-излучения, однако все эти эффекты корректируются на этапе разработки композиции газов и выборе интенсивности и длительности

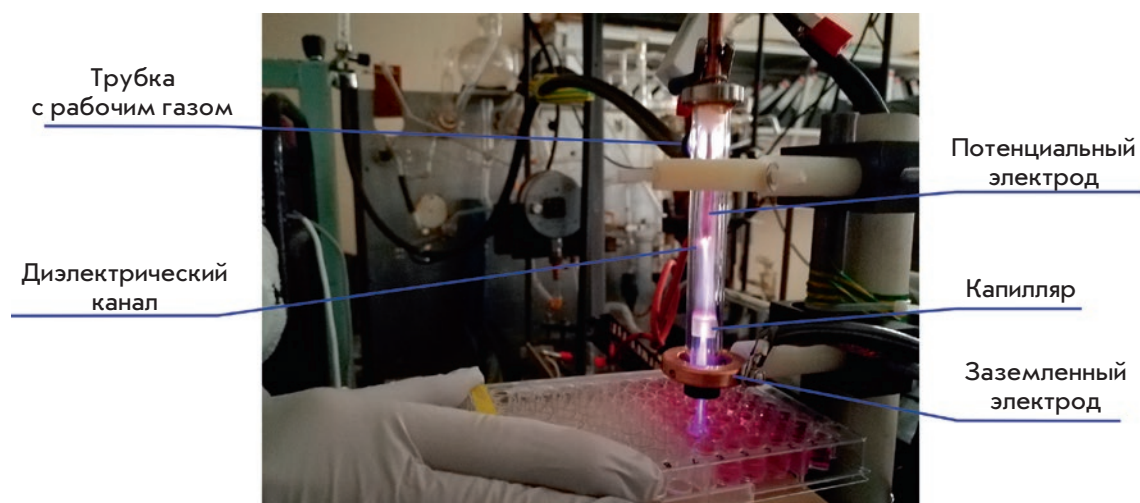


Рис. 1. Установка с газоразрядным устройством для облучения растущих клеток

облучения. Безопасность применения ХПС показана на пациентах с хроническими язвенными поражениями кожи [4, 5]. ХПС представляет собой последовательность стримеров, генерируемых в инертных газах в диэлектрическом канале плазменного устройства и распространяющихся по струе газа в окружающем воздухе при атмосферном давлении. Возбуждение и ионизация смеси газов, состоящей из инертного газа, азота, кислорода и паров воды, осуществляются за счет высокоэнергетичных электронов и большой концентрации плазмы в головке стримера, где электрические поля могут достигать 10–20 кВ/см. В плазменно-стимулированных химических реакциях образуются различные активные кислородсодержащие и азотсодержащие соединения, такие, как H_2O_2 , HNO_2 , HNO_3 , N_2O , NO_2 , NO , N_2O_3 . В качестве рабочего газа в плазменном устройстве обычно используют инертные газы, так как напряжение пробоя воздуха значительно выше. Привлекательной особенностью плазменной струи для реализации противоопухолевых подходов является низкая температура в области контакта холодной плазмы с биологическим объектом [3]. Показано цитотоксическое действие холодной плазменной струи в отношении более 20 линий опухолевых клеток различного гистогенеза и в экспериментальных моделях *in vivo* на животных-опухоленосителях [6]. Обнаружено, что основными триггерными молекулами гибели клеток при воздействии ХПС являются активные формы кислорода (ROS) и азота (RNS). Ключевую роль среди ROS отводят молекулам H_2O_2 , которые могут вызывать повреждения митохондрий и ДНК [7]. Экспериментально показано, что при обработке ХПС клетки подвергаются именно синергическому воздействию молекул H_2O_2 , NO_2 и NO_3 , но RNS гораздо менее цитотоксичны, чем ROS [8].

Обработка ХПС не только вызывает цитотоксические эффекты, но также может восстанавливать чувствительность устойчивых опухолевых клеток к цитостатическим средствам, например, глиобластомы к темозоломиду [9].

В данном исследовании использовано оригинальное устройство, генерирующее плазменную струю, которое позволяет в широких пределах изменять режимы стримерного пробоя в диэлектрическом канале и динамику распространения последовательности стримеров по струе инертных газов (рис. 1). Проведено сравнение воздействия ХПС в гелии и аргоне на опухолевые клетки человека. Использование двух рабочих газов было мотивировано тем, что аргон и гелий имеют разные физические свойства, а именно, 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.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Газоразрядное устройство представляло собою диэлектрический коаксиальный канал длиной 100 мм с внутренним диаметром 8 мм, в который соосно вставлены металлический (медный) электрод длиной 50 мм и диаметром 2 мм и капилляр длиной 6 мм с внутренним диаметром 2.6 мм, которые, в свою очередь, фиксировались кварцевой втулкой длиной 23 мм и внутренним диаметром 5 мм. Снаружи кварцевого канала располагался медный кольцевой электрод. Разрядная зона образована внутренним (потенциальным) и внешним (заземленным) электродами. Синусоидальное напряжение с частотой ~ 25 кГц и амплитудой до 6 кВ, формиру-

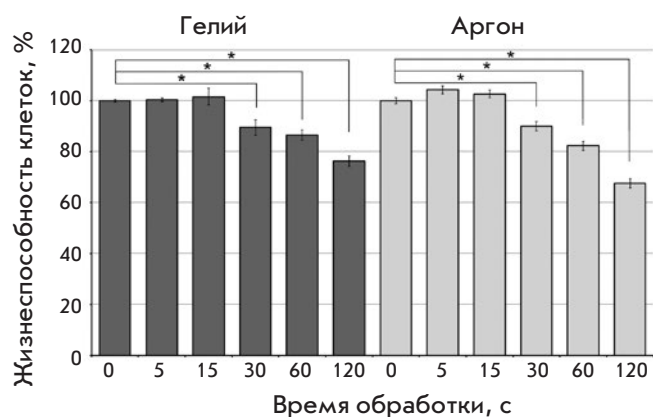


Рис. 2. Влияние холодной плазменной струи на жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого A549. Напряжение 4.2 кВ. Жизнеспособность контрольных (необработанных) клеток принята за 100%. Данные МТТ-анализа представлены как среднее значение трех независимых экспериментов $\pm$ стандартное отклонение, * $p < 0.05$

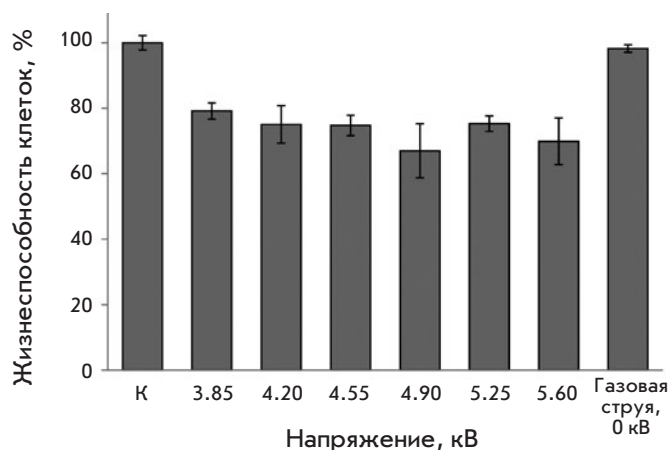


Рис. 3. Влияние напряжения холодной плазменной струи в аргоне на цитотоксическую активность в отношении клеток A549. Данные МТТ-анализа, проведенного через 48 ч после облучения. К – контрольные (необработанные клетки). Данные представлены как среднее значение трех независимых экспериментов $\pm$ стандартное отклонение

емое генератором высоковольтных импульсов, прикладывалось к потенциальному электроду. Газовая система обеспечивала поступление рабочих газов с типичными скоростями потока до 15 л/мин при избыточном давлении в газовой магистрали 1 атм. Эксперименты проведены с рабочими газами гелием и аргонном.

При прокачке рабочего газа и подаче синусоидального напряжения U на положительной полуволне между потенциальным и заземленным электродами наблюдается пробой, и при дальнейшем увеличении $U > 1-3$ кВ в зависимости от газа и скорости потока формировалась плазменная струя, которая «вываливается» из диэлектрического канала и распространяется в свободном пространстве. Типичная длина струи в зависимости от параметров возбуждения: в гелии 5–50 мм, в аргоне 5–20 мм.

В работе использовали клетки A549 аденокарциномы легкого человека (РККП Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM (GIBCO, США) в присутствии 2 mM L-глутамина (Sigma-Aldrich, США), 10% FBS (GIBCO, США) и раствора антибиотика-антимикотика (100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина сульфата, 0.25 мкг/мл амфотерицина; GIBCO, США) при температуре $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ в атмосфере $5.0 \pm 0.5\%$ CO_2 .

Для обработки ХПС клетки культивировали в 96-луночных планшетах (4×10^3 клеток на лунку) в объеме 100 мкл. По достижении 70–80% моно-

слоя клетки обрабатывали холодной плазменной струей. После этого клетки растили в стандартных условиях в течение 24 ч, затем среду в лунках заменяли на среду RPMI без сыворотки, содержащую 0.25 мг/мл МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) (Sigma, США), и инкубировали в течение 4 ч при 37°C . Далее, из лунок удаляли среду и растворяли кристаллы формазана в ДМСО. Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на многоканальном спектрофотометре (Berthold Technologies, Германия) при $\lambda = 570$ нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние струи холодной плазмы на выживаемость опухолевых клеток изучали на линии клеток A549 аденокарциномы легкого человека. Методом МТТ показано, что жизнеспособность клеток снижается по мере увеличения времени обработки с 5 с до 2 мин. Кратковременная (до 30 с) обработка клеток струей холодной плазмы практически не влияла на выживаемость клеток (рис. 2). Максимальное снижение жизнеспособности клеток достигалось при обработке в течение 2 мин при использовании как гелия, так и аргона.

Гибель клеток визуализировали с использованием йодида пропидия (PI) – низкомолекулярного флуоресцентного красителя, который интеркалирует в ДНК гибнущих клеток с поврежденной мембраной, но не проникает в живые клетки. Обнаружено, что доля окрашенных клеток воз-

растала с увеличением времени обработки струей холодной плазмы (данные не приведены). Таким образом, показано, что обработка клеток ХПС индуцирует их гибель.

Величина напряжения на нагруженном электроде при использовании плазменной струи является одним из основных параметров, который определяет динамику плазменной струи и характер ее взаимодействия с поверхностью. От приложенного напряжения зависит энергия электронов в плазменной струе, скорость процессов ионизации, диссоциации и возбуждения молекул, вызванных электронным ударом, что может сильно влиять на индуцируемые плазмохимические процессы, и, как следствие, на биологический эффект плазменной струи. Для анализа влияния напряжения, подаваемого на нагруженный электрод в плазменном устройстве, генерирующем ХПС, на цитотоксическую активность в отношении клеток А549 применяли прямое облучение при различных амплитудах переменного напряжения. Экспериментально обнаружено, что изменение амплитуды напряжения в аргоне в диапазоне 3.8–5.6 кВ не повлияло на уровень гибели клеток (рис. 3). Дополнительные исследования воздействия на клетки потока инертного газа без плазменной струи и при нулевом напряжении показали, что поток аргона и гелия не влиял на жизнеспособность облученных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на линии клеток А549 аденокарциномы легкого показано, что прямое воздействие холодной плазменной струи вызывает гибель опухолевых клеток. Возможность использования разнообразных режимов воздействия на инертные газы, в том числе и на их смеси с молекулярными газами, в применяемом газоразрядном устройстве позволяет генерировать холодную плазменную струю с широким набором энергетических параметров и компонентным составом, что является преимуществом представленной работы. Дальнейшая оптимизация устройств на основе диэлектрических каналов различной геометрии, а также применение опосредованного воздействия на клетки через предварительно облученную культуральную среду позволят подобрать оптимальные условия воздействия холодной плазменной струи на клетки злокачественных опухолей человека. Безопасность воздействия ХПС на ткани человека уже была показана ранее, поэтому возможность практического применения этого метода в отношении определенных опухолевых новообразований не вызывает сомнений. ●

*Исследование поддержано грантом РНФ
№ 19-19-00255 и частично проектом базового
бюджетного финансирования Минобрнауки РФ
(0245-2019-0001).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hideghéty K., Brunner S., Cheesman A., Szabó E.R., Polanek R., Margarone D., Tóké T., Mogyorósi K. // *Anticancer Res.* 2019. V. 39. № 5. P. 2265–2276.
2. Laprie A., Hu Y., Alapetite C., Carrie C., Habrand J.-L., Bolle S., Bondiau P.-Y., Ducassou A., Huchet A., Bertozzi A.-I., et al. // *Cancer/Radiothérapie.* 2015. V. 19. № 8. P. 775–789.
3. Utsumi F., Kajiyama H., Nakamura K., Tanaka H., Mizuno M., Ishikawa K., Kondo H., Kano H., Hori M., Kikkawa F. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 12. P. e81576.
4. Isbary G., Heinlin J., Shimizu T., Zimmermann J., Morfill G., Schmidt H., Monetti R., Steffes B., Bunk W., Li Y., et al. // *Br. J. Dermatol.* 2012. V. 167. № 2. P. 404–410.
5. Ulrich C., Kluschke F., Patzelt A., Vandersee S., Czaika V., Richter H., Bob A., Hutten Jv., Painsi C., Hüge R., Kramer A., Assadian O., Lademann J., Lange-Asschenfeldt B. // *J. Wound Care.* 2015. V. 24. № 5. P. 198–200.
6. Keidar M. // *Plasma Sources Sci. Technol.* 2015. V. 24. № 3. P. 033001.
7. Bekeschus S., Iseni S., Reuter S., Masur K., Weltmann K.D. // *IEEE Trans. Plasma Sci.* 2015. V. 43. № 3. P. 776–781.
8. Wende K., Williams P., Dalluge J., van Gaens W., Aboubakr H., Bischof J., von Woedtke T., Goyal S.M., Weltmann K.-D., Bogaerts A., et al. // *Biointerphases.* 2015. V. 10. № 2. P. 029518.
9. Köritzer J., Boxhammer V., Schäfer A., Shimizu T., Klämpfl T.G., Li Y.-F., Welz C., Schwenk-Zieger S., Morfill G.E., Zimmermann J.L., et al. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 5. P. e64498.