

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

На правах рукописи

Бирюков Михаил Михайлович

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ КАСКАДЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СЕЛЕКТИВНОСТЬ
ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ АТМОСФЕРНОГО
ДАВЛЕНИЯ В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

1.5.4 – биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.б.н. Коваль Ольга Александровна

Новосибирск – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: ХОЛОДНАЯ ПЛАЗМА И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЕЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ.....	11
1.1 Принципы генерации холодной плазмы атмосферного давления	11
1.2 Активные формы кислорода и азота, их функции и пути образования в клетке	13
1.2.1 Пути образования активных форм кислорода и азота внутри клетки	17
1.3 Антиоксидантные системы клетки.....	18
1.3.1 Антиоксидантные ферменты	19
1.3.2 Низкомолекулярные антиоксиданты.....	22
1.4 Окислительный стресс.....	23
1.5 Методы качественного и количественного определения активных форм кислорода и азота.....	23
1.6 Активные формы кислорода и азота, генерируемые в потоке холодной плазмы, их взаимодействия между собой и с компонентами окружающей среды.	29
1.6.1 Процессы, приводящие в генерации АФКА в потоке плазмы	29
1.6.2 Взаимодействия АФКА на поверхности раздела газ/жидкость и химические реакции в жидкости	31
1.7 Молекулярный механизм ответа опухолевых клеток на обработку холодной плазмой.....	32
1.7.1 Сигнальные пути, активируемые в клетке в ответ на накопление АФКА и окислительный стресс.....	33
1.7.2 Биологические процессы, активируемые в клетках в ответ на обработку холодной плазмой	37
1.8 Отличия опухолевых и нетрансформированных клеток, потенциально влияющих на чувствительность к АФКА	50
1.9 Факторы, влияющие на чувствительность клеток к обработке ХПС	53
1.10 Подходы к противоопухолевому применению холодной плазмы <i>in vivo</i>	54

Заключение	59
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	61
2.1 Материалы и оборудование.....	61
2.1.1 Реактивы и материалы	61
2.1.2 Оборудование.....	62
2.1.3 Буферы и растворы	63
2.1.4 Олигонуклеотиды.....	64
2.1.5 Клеточные культуры	64
2.1.6 Лабораторные животные	65
2.2 Методы	66
2.2.1 Культивирование эукариотических культур клеток.....	66
2.2.2 Обработка клеток ХПС	66
2.2.3 Оценка жизнеспособности клеток (МТТ-тест).....	67
2.2.4 Оценка пролиферации клеток в реальном времени.....	68
2.2.5 Анализ активации апоптоза при помощи системы аннексин V-йодид пропидия.....	68
2.2.6 Анализ изменения концентраций внутриклеточных активных форм кислорода при прямой обработке ХПС.....	68
2.2.7 Определение концентраций внеклеточных нитрит-ионов в среде после обработки ХПС.....	69
2.2.8 Выделение суммарной РНК из клеток	69
2.2.9 Анализ транскриптома клеток.....	70
2.2.10 Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени	70
2.2.11 Приготовление лизатов клеток и измерение концентрации белка в лизатах	71
2.2.12 Электрофорез лизатов клеток в полиакриламидном геле	71
2.2.13 Электроперенос белков на мембрану и вестерн-блот.....	72
2.2.14 Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла.....	72

2.2.15 Анализ повреждения ДНК клеток методом ДНК-комет	73
2.2.16 Просвечивающая электронная микроскопия	73
2.2.17 Получение лизатов митохондрий	74
2.2.18 Исследование деполяризации мембран митохондрий.....	74
2.2.19 Определение активации каспаз 3 и 7	74
2.2.20 Анализ перекисного окисления липидов	75
2.2.21 Оценка противоопухолевой эффективности <i>in vivo</i>	75
2.2.22 Статистический анализ данных	76
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	77
3.1 Определение условий генерации ХПС и обработки, обеспечивающих преимущественную гибель опухолевых клеток	77
3.2 Динамика внутриклеточных и внеклеточных активных форм кислорода и азота после воздействия ХПС	82
3.2.1 Динамика концентраций внеклеточных нитрит-ионов в культуральной среде клеток после обработки ХПС	82
3.2.2 Изменение баланса АФКА внутри клеток после обработки ХПС	84
3.2.3 Динамика перекисных повреждений липидов мембран клеток после обработки ХПС.....	86
3.3 Изменения в транскриптоме клеток после обработки ХПС.....	88
3.3.1 Предобработка «сырых» данных, оценка качества прочтений, фильтрация, нормализация и кластерный анализ образцов транскриптомов	90
3.3.2 Отличия в транскриптомах клеточных линий А-549 и здоровых фибробластов легкого Wi-38, определяющие метаболическую активность клеток и чувствительность к окислительному стрессу	92
3.3.3 Дифференциально экспрессирующиеся гены в образцах клеток после обработки ХПС.....	98
3.3.4 Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов в клетках, обработанных ХПС.....	100
3.4 Молекулярные механизмы, задействованные в ответе клеток на обработку ХПС	111

3.4.1 Изменение экспрессии генов раннего ответа на стресс в клетках, обработанных ХПС	111
3.4.2 Изменения в прогрессии клеточного цикла клеток, обработанных ХПС	113
3.4.3 Повреждение геномной ДНК в клетках, обработанных ХПС	115
3.4.4 Индукция стресса эндоплазматического ретикулума в ответ на обработку ХПС	119
3.4.5 Индукция аутофагии в ответ на обработку клеток ХПС	123
3.4.6 Индукции апоптоза в ответ на обработку клеток ХПС	132
3.4.7 Изменение экспрессии гена глутатионпероксидазы 4 и содержания белка GRX4 в ответ на обработку ХПС в опухолевых и здоровых клетках легкого человека	137
3.6 Исследование противоопухолевой эффективности ХПС <i>in vivo</i>	140
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	147
ВЫВОДЫ.....	152
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	154
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	155
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	159
ПРИЛОЖЕНИЕ А	181
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	186

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наиболее распространенные подходы к терапии онкологических заболеваний включают в себя хирургическую резекцию в случае солидных опухолей, химиотерапию, лучевую, гормональную терапию, иммунотерапию и различные варианты таргетной терапии. Химиотерапия характеризуется низкой селективностью воздействия и, как следствие, серьезными системными побочными эффектами [1]. Кроме того, клетки опухолей способны приобретать резистентность как к препаратам химиотерапии, так и к таргетным препаратам [2]. Эти факторы обуславливают актуальность разработки новых подходов к терапии онкологических заболеваний, в том числе основанных на физико-химических воздействиях.

Холодная плазма представляет собой частично ионизированный под действием электромагнитного поля газ, в потоке которого образуются активные формы кислорода и азота (АФКА). Состав АФКА может быть изменен путем модификации параметров газового разряда и состава газа. Интенсивные исследования применения холодной плазмы в биомедицине начались в 1990-е – 2000-е годы, когда было показано стерилизующее действие холодной плазмы в отношении бактерий и вирусов, а также ранозаживляющие свойства при воздействии на поврежденные ткани. Эти работы привели к исследованию возможности применения холодной плазмы для воздействия на опухолевые новообразования. Было показано, что при определенных параметрах газового разряда плазма способна оказывать цитотоксическое и цитостатическое действие на онкотрансформированные клетки человека в культуре, а также *in vivo* на животных с трансплантированными опухолями. Успехи в экспериментах на животных стимулировали развитие технологий создания плазма-генерирующих устройств различной геометрии, некоторые из которых прошли первую стадию клинических исследований (2023 год, США). Несмотря на достигнутые успехи, механизм противоопухолевого действия и параметры, определяющие селективность воздействия холодной плазмы на опухолевые клетки, остаются не до конца изученными, что препятствует внедрению этого подхода в клинику и вовлечению в терапию дополнительных молекулярных мишеней. Кроме того, разнообразие устройств-генераторов холодной плазмы, находящихся на разных ступенях разработки и функционирующих в разных диапазонах напряжений и частот тока, а также работающих с разными рабочими газами, делают актуальной проблемой стандартизацию параметров и доз обработки для достижения противоопухолевых эффектов.

Подавляющее большинство описанных в литературе устройств разработаны в США, Германии, Южной Корее, Японии, Нидерландах и других странах мира. Существует потребность в разработке генераторов холодной плазмы отечественного производства для исследований в области онкологии. В 2018-м году сотрудниками Института теоретической и прикладной механики (ИТПМ) им. С.А. Христиановича и Института физики полупроводников (ИФП) им. А.В. Ржанова СО РАН под руководством д.ф.-м.н. Швейгерт И.В. и д.ф.-м.н. Закревского Д.Э. был создан оригинальный генератор холодной плазменной струи (ХПС). Экспериментальная установка позволяет, основываясь на данных физических и биологических экспериментов, а также на данных математического моделирования плазмохимических реакций варьировать в широких диапазонах параметры газового разряда: электродную конфигурацию, тип и амплитуду напряжения, частоту, состав используемого газа. Было показано, что применение дополнительного заземленного электрода позволяет усилить генерацию •ОН в потоке плазмы и противоопухолевый эффект ХПС [3]. Сотрудниками Лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН было показано цитотоксическое действие ХПС в аргоне и гелии в отношении клеток карциномы кожи человека А-431, рабдомиосаркомы мыши МХ-7, карциномы толстой кишки мыши СТ-26. Кроме того, было показано, что клетки неопухолевого происхождения, такие как клетки надпочечников эмбриона человека НЕК-293Т, проявляли меньшую чувствительность к действию ХПС. Были найдены оптимальные диапазоны параметров облучения ХПС, не вызывающие нагрева биоматериала и индуцирующие гибель клеток [4]. Была также показана способность ХПС индуцировать гибель клеток с признаками иммуногенной гибели, однако в экспериментах *in vivo* пока не удалось достигнуть эффективных режимов облучения клеток для демонстрации вакцинирующих свойств [5,6].

Таким образом, стало возможным проведение исследований, решающих актуальную задачу по определению молекулярных механизмов, определяющих селективную гибель опухолевых клеток в ответ на обработку ХПС.

Целью исследования было выявление ключевых молекулярных каскадов, определяющих селективность цитотоксического действия холодной плазмы в отношении опухолевых клеток. Для достижения цели были сформулированы следующие задачи:

1. Определить параметры обработки культивируемых клеток человека струей холодной плазмы, обеспечивающие снижение жизнеспособности преимущественно опухолевых клеток.

2. Изучить динамику уровней внеклеточных и внутриклеточных АФКА, а также продуктов перекисного окисления липидов после обработки ХПС в опухолевых А-549 и здоровых Wi-38 клетках легкого человека в культуре.
3. Выявить базовые различия в транскрипционной активности клеток А-549 и Wi-38, потенциально обеспечивающие разную чувствительность к окислительному стрессу.
4. Изучить ранний и поздний ответы здоровых и опухолевых клеток на облучение ХПС на основании анализа транскриптома и анализа изменений основных молекулярных маркеров на примере клеточных линий А-549 и Wi-38. Предложить молекулярную модель, объясняющую селективность ХПС по отношению к опухолевым клеткам.
5. Исследовать противоопухолевую активность ХПС на мышинной модели.

Научная новизна полученных результатов и практическая значимость

В рамках данной работы впервые проведено комплексное исследование молекулярных механизмов ответа опухолевых и нетрансформированных клеток человека на обработку струей холодной плазмы, направленное на выявление ключевых молекулярных каскадов, определяющих относительную селективность цитотоксического действия холодной плазмы в отношении опухолевых клеток. Показано, что применение параметров струи, обеспечивающих полуселективное онкосупрессорное действие *in vitro*, оказывает противоопухолевые эффекты при прямой обработке ХПС *in vivo*.

Впервые проведен сравнительный анализ транскриптома опухолевых и неопухолевых клеток одного гистологического происхождения и показано, что обработка ХПС приводит к транскрипционным изменениям в обеих культурах клеток. Показано, что селективность воздействия обусловлена индукцией стресса ЭПР в опухолевых, но не в здоровых клетках. Продемонстрирована взаимосвязь между инициацией ответа на стресс ЭПР, аутофагии и апоптоза в обработанных опухолевых клетках. Проведена оптимизация режимов обработки ХПС для применения на животных-опухоленосителях и показан противоопухолевый потенциал обработки.

Полученные данные могут служить основой для подбора препаратов-партнеров для таргетного воздействия на выявленные сигнальные пути. Комбинация обработки ХПС с этими препаратами позволит повысить эффективность и безопасность воздействия, снизив дозу облучения, а также увеличить селективность терапии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Варьирование параметров прямой обработки клеток холодной плазменной струей (ХПС) позволяет добиться селективной гибели опухолевых клеток без увеличения температуры обрабатываемого объекта выше 40°C.
2. Динамика концентраций активных форм кислорода и азота (АФКА) в культуральной среде и внутри опухолевых и здоровых клеток после воздействия ХПС отражает генерацию вторичных АФКА и длительность нахождения клеток в состоянии окислительного стресса.
3. Обработка ХПС в условиях, индуцирующих селективную гибель опухолевых клеток, вызывает повреждения ДНК, которые эффективно подвергаются репарации в клетках.
4. Клетки аденокарциномы легкого А-549 в сравнении с фибробластами легкого Wi-38 характеризуются повышенной экспрессией генов, вовлеченных в анаболические процессы, а также генов, обеспечивающих нейтрализацию АФКА и репарацию окислительных повреждений биомолекул.
5. Индукция аутофагии является ранним ответом на облучение ХПС и направлена на поддержание гомеостаза клетки. Ингибитор аутофагии хлорохин усиливает цитотоксическое действие ХПС *in vitro*.
6. Активация сигнального пути СНОР вследствие окислительного стресса ингибирует аутофагию и стимулирует стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР), направленный на гибель клетки. Активация ответа на стресс ЭПР характерна только для опухолевых клеток.
7. Обработка ХПС опухолевых узлов мышей приводит к торможению роста опухолей в режиме монотерапии.

Апробация результатов и публикации

Материалы диссертации вошли в 4 публикации в рецензируемых научных журналах: Biomolecules, Cells, Plasma Medicine, Plasma Sources Science and Technology. Результаты были представлены на 10 конференциях.

Личный вклад автора

Основная часть работы выполнена либо автором лично, либо при его непосредственном участии на всех этапах проведения исследования. Планирование экспериментов и обсуждение результатов проведено под руководством д.б.н. Коваль О.А.

Обработка клеток холодной плазменной струей выполнена либо автором, либо сотрудниками Лаборатории биотехнологии: Патраковой Е.А., Крячковой Н.В., Поляковой А.А., в Институте физики полупроводников СО РАН совместно с Милахиной Е.В. (ИФП СО РАН), д.ф.-м.н. Закревским Д.Э. (ИФП СО РАН) и д.ф.-м.н. Швейгертом И.В. (ИТПМ СО РАН). Эмиссионные спектры плазменной струи записаны сотрудниками ИФП СО РАН: Милахиной Е.В. (ИФП СО РАН), д.ф.-м.н. Закревским Д.Э.. Подготовка библиотек и секвенирование транскриптома клеток проводилось в Междисциплинарном центре коллективного пользования Казанского федерального университета. *In silico* анализ транскриптома клеток в одном из его вариантов выполнен с.н.с. Лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН к.х.н. Семеновым Д.В. Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов выполнен автором совместно с Семеновым Д.В. Электронная микроскопия образцов клеток проведена в группе микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН Полетаевой Ю.Е. Эксперименты *in vivo* проводились совместно с Поляковой А.А., Крячковой Н.В., Варламовым М.Е. и к.б.н. Троицкой О.С.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы, содержащего 300 источников. Работа содержит 197 страниц, 61 рисунок, 24 таблицы, 2 приложения.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: ХОЛОДНАЯ ПЛАЗМА И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЕЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ

Плазма представляет собой частично ионизированный газ, состоящий из свободных электронов, ионов и нейтральных частиц. Это четвертое агрегатное состояние вещества, которое возникает при передаче газу энергии, достаточной для возникновения газового разряда. В отличие от твердого, жидкого и газообразного состояний, плазма характеризуется наличием свободных заряженных частиц: ионов и электронов, что приводит к возникновению электрических полей и электромагнитных взаимодействий. Плазма характеризуется высокой электропроводностью, «коллективным поведением» составляющих ее частиц, взаимодействующих друг с другом посредством дальнедействующих электромагнитных полей, а также широким диапазоном температур [7,8]. Температура плазмы отражает термодинамическое равновесие между энергиями легких частиц – электронов – и тяжелых частиц – ионов и нейтральных молекул/атомов. В высокотемпературных плазмах естественного происхождения, например, в звездах, или плазме, созданной в лаборатории, например, в термоядерных реакторах, разница температур электронов и ионов невелика или отсутствует вовсе, тогда как в низкотемпературных плазмах температура электронов может достигать десятков и сотен тысяч кельвинов, а температура более тяжелых частиц – не отличаться от комнатной [9]. Температура плазмы зависит от сообщенной газу энергии и степени ионизации, от плотности частиц и давления, при котором плазма генерируется. В биомедицинских исследованиях находит применение плазма, генерируемая при атмосферном давлении и имеющая температуру ниже 40°C, такую плазму называют низкотемпературной или холодной плазмой атмосферного давления. Эта технология генерации плазмы стала широко распространяться в 1990-е годы, и в настоящее время холодная плазма атмосферного давления применяется в большом количестве направлений биомедицинских исследований. Наиболее значимые из них – обеззараживание и модификация поверхностей, дерматология и онкология.

1.1 Принципы генерации холодной плазмы атмосферного давления

Для генерации холодной плазмы используют два основных типа разрядов: диэлектрический барьерный разряд (ДБР) и холодную плазменную струю (ХПС) (Рисунок 1).

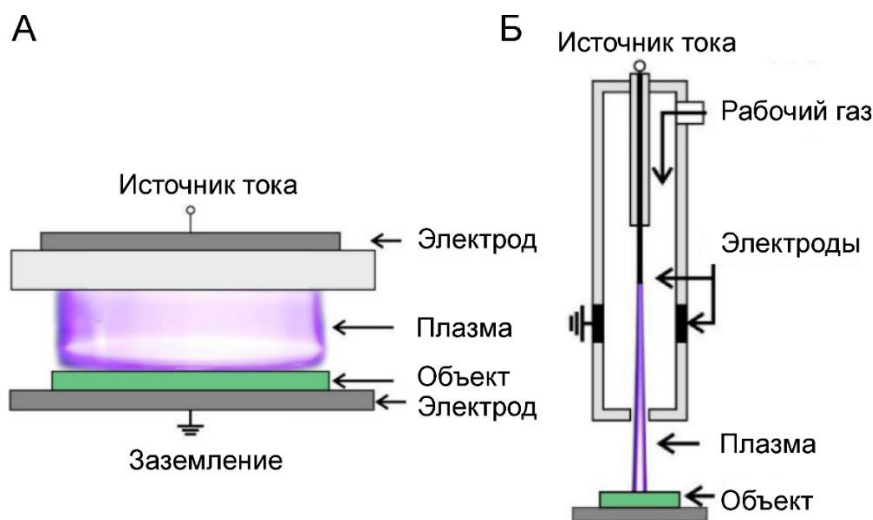


Рисунок 1 – Схема генераторов холодной плазмы, работающих по принципу диэлектрического барьерного разряда (А) и холодной плазменной струи (Б) [10].

ДБР генерируется между двумя электродами, один или оба из которых покрыты диэлектрическим материалом. На электроды подается высокое переменное синусоидальное или импульсное напряжение с амплитудой от нескольких сотен вольт до нескольких десятков киловольт и частотой порядка нескольких килогерц [11]. Возникающие разряды в газе приводят к генерации плазмы между электродами. Такие устройства удобны для обработки больших поверхностей и объемов жидкости.

Плазменная струя генерируется внутри трубки, через которую пропускается рабочий газ. Плазма образуется внутри трубки и распространяется к обрабатываемому объекту вместе с потоком газа. Такая конструкция позволяет минимизировать электрическое и тепловое воздействие на объект [12], а также сделать воздействие более точечным. Кроме того, в устройствах такого типа можно контролировать подачу газа и параметры разряда. В качестве рабочего газа в генераторах плазменной струи обычно используют благородные газы, такие как аргон и гелий, в отличие от устройств, работающих по принципу ДБР, в которых часто используется атмосферный воздух [13]. Выбор благородных газов обусловлен более низким напряжением пробоя, чем у воздуха, возможностью достижения более высоких энергий электронов и большей стабильностью разряда, высокой теплопроводностью газов [14,15].

Конструкция генераторов холодной плазмы может изменяться посредством использования дополнительных электродов или изменения геометрии газоразрядной камеры. Такие модификации позволяют минимизировать влияние окружающей среды на состав потока плазмы, повысить концентрацию определенных соединений, а также увеличить стабильность параметров разряда.

При газовом разряде, а также при распространении потока плазмы в окружающую среду происходит образование большого количества активных форм кислорода и азота (АФКА). Считается, что АФКА обуславливают основную часть биологических эффектов плазмы. Стоит также отметить, что в биологический эффект потока плазмы могут вносить вклад излучение ультрафиолетового диапазона, электромагнитные поля и электрический ток. Эти факторы участвуют в генерации АФКА, однако в установках для биомедицинского применения их вклад минимизируется для исключения побочных эффектов *in vivo* [16].

Для изучения биологических эффектов холодной плазмы используют два основных подхода: прямое воздействие потока плазмы на биологический объект и опосредованное, или не прямое, воздействие. При не прямом воздействии обработке плазмой подвергают растворы различного состава: от физиологического раствора до культуральной среды, которые либо сразу добавляют к биологическому объекту, например к клеткам, или вводят экспериментальному животному; либо хранят и добавляют к объекту по мере необходимости. Очевидно, что при долгом хранении в растворах сохраняются только долгоживущие АФКА, а также продукты модификации биомолекул и при изучении биологических эффектов исключается любое воздействие излучения в УФ-диапазоне, протекание тока и т.д. При этом важное значение для сохранения цитотоксических свойств имеет температура хранения таких растворов, так как этот параметр определяет скорости реакций АФКА с растворенными веществами [17].

1.2 Активные формы кислорода и азота, их функции и пути образования в клетке

Активными формами кислорода (АФК) называют все атомы/ионы/молекулы, которые являются производными молекулярного кислорода O_2 и реакционная способность которых превышает таковую у кислорода [18]. В англоязычной литературе этому термину соответствует термин “reactive oxygen species”.

Основное состояние молекулярного кислорода – триплетное 3O_2 $1s^2 2s^2 2p^4$, такая молекула содержит два неспаренных электрона с параллельными спинами на разрыхляющих π -орбиталях, по этой причине реакционная способность триплетного кислорода с органическими молекулами ограничена [19]. Кислород может подвергаться одноэлектронному восстановлению с образованием различных АФК. Рассмотрим основные из них, воздействию которых подвергаются молекулы клетки.

1. Синглетный кислород (1O_2) представляет собой возбужденное состояние двухатомного кислорода либо со спаренными электронами (дельта-состояние), либо с

двумя неспаренными электронами, имеющими антипараллельные спины (сигма-состояние). За счет преодоления спинового ограничения окислительная способность синглетного кислорода значительно выше, чем у кислорода в основном состоянии, однако время жизни кислорода в сигма-состоянии составляет пикосекунды и слишком мало, чтобы иметь какой-либо эффект в живых системах, время полужизни кислорода в дельта-состоянии составляет микросекунды, что позволяет ему реагировать с биомолекулами. Так, синглетный кислород образуется в процессе фотодинамической терапии при переносе энергии с молекул фотосенсилизатора на молекулы триплетного кислорода [20], при этом энергии фотонов видимого света достаточно для возбуждения. Синглетный кислород способен окислять гуанин в нуклеиновых кислотах с образованием 8-оксогуанина, другие азотистые основания не подвергаются окислительным повреждениям этой АФК [21]. Кроме того, возможны реакции синглетного кислорода с триптофаном, гистидином, тирозином, метионином и цистеином [22].

2. Супероксид анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$) (в литературе также употребляют названия «супероксид», «супероксид-радикал», «супероксид-анион») – продукт одноэлектронного восстановления триплетного кислорода и наиболее распространенная АФК в живых клетках. Несмотря на высокие значения окислительно-восстановительных потенциалов для пар $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ и $O_2^{\cdot-}/H_2O$, 0,93 и 0,81 В, соответственно, константы скоростей реакций супероксид-радикала с большинством биомолекул составляют менее $10^2 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и только для цитохрома С, аскорбата и супероксиддисмутазы (СОД), для которой эта АФК является субстратом, скорости варьируют от 10^5 до $10^9 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [23]. Супероксид анион-радикал в клетке может подвергаться превращению в пероксид водорода под действием СОД, а также образовывать гидроксил-радикал в реакции Габера-Вейса, катализируемой ионами переходных металлов, в том числе железа (реакции 1-3).



Суммарная реакция:



3. Гидроксил-радикал ($HO^{\cdot}$) – наиболее сильный окислитель в живых системах ($E^{\circ}(HO^{\cdot}/H_2O) = 2,34 \text{ В}$), константы скорости реакций которого с биомолекулами достигают $10^{10} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, а скорость-лимитирующей стадией является диффузия [23]. Несмотря на это, за счет короткого времени существования, которое составляет от нескольких наносекунд до нескольких микросекунд [24], и низкой избирательности действия,

диффузия гидроксил-радикалов ограничена. По этим же причинам в клетках отсутствуют системы активной нейтрализации $\text{HO}^\bullet$.

4. Пероксид водорода (H_2O_2) является сильным окислителем, однако скорости реакций его с молекулами клетки относительно невысоки из-за значительной энергии активации, поэтому эта АФК может накапливаться в клетках, транспортироваться через мембраны и служить средством передачи внутриклеточных сигналов [25]. Так, пероксид водорода может окислять остатки метионина или цистеина в редокс-чувствительных белках [26]. В присутствии ионов переходных металлов пероксид водорода может генерировать гидроксил-радикалы в реакциях Фентона (реакция 2) и Габера-Вейса.

5. Озон (O_3) обладает большей реакционной способностью с биомолекулами, чем H_2O_2 . В реакции вступают, как правило, либо сама молекула озона, либо продукты распада в водной фазе, например, гидроксил-радикалы [27]. Константы скоростей реакций озона с аминокислотами белков достигают $4,4 \times 10^6 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [28]. O_3 также способен приводить к перекисному окислению липидов, образованию разрывов ДНК (обусловлены преимущественно действием $\text{HO}^\bullet$) и окислительных повреждений оснований (обусловлены действием O_3) [29].

По аналогии с АФК выделяют и активные формы азота (АФА), которые являются производными монооксида азота (NO). Монооксид азота – это незаряженная молекула, которая имеет неспаренный электрон, но не отличается высокой реакционной способностью. Монооксид азота образуется как побочный продукт в реакции биосинтеза цитрулина из аргинина, катализируемой ферментами семейства NADPH-зависимых NO-синтаз. Существует три типа этих ферментов: индуцибельная, эндотелиальная и нейрональная синтазы [30]. NO является важной сигнальной молекулой, которая взаимодействует с растворимой гуанилатциклазой (sGC), которая катализирует образование циклического гуанозинмонофосфата – вторичного мессенджера, участвующего в процессах регуляции как на клеточном, так и на организменном уровне [31]. NO участвует в обратимом нитрозилировании белков по остаткам тирозина, что может приводить к нарушению циклов фосфорилирования/дефосфорилирования сигнальных белков [32].

Рассмотрим основные АФА, образующиеся из монооксида азота.

1. Пероксинитрит (ONOO^-) образуется при взаимодействии NO с супероксид-радикалом, его протонированная форма ($\text{pK}_a=6,8$) может самопроизвольно разлагаться с образованием нитрит-иона (NO_2^-) и гидроксил-радикала [33]. Скорость реакции пероксинитрит-аниона с тиолами, в том числе окисление тиольных групп белков, выше, чем у пероксида водорода, примерно на 3 порядка [33]. ONOO^- участвует в реакциях одно- и

двухэлектронного окисления и может прямо или опосредовано (при разложении с образованием гидроксил-радикала) модифицировать белки, липиды, углеводы и нуклеиновые кислоты [34]. Кроме того, важной в физиологических условиях является реакция пероксинитрита с диоксидом углерода с образованием карбонат-радикала ($\text{CO}_3^{\cdot-}$).

2. Диоксид азота ($\text{NO}_2^{\cdot}$) – продукт реакции пероксил-радикалов ($\text{RO}_2^{\cdot}$) с монооксидом азота. В водной среде взаимодействие двух радикалов диоксида азота приводит к димеризации с образованием N_2O_4 , который реагирует с водой, образуя нитрит- и нитрат-ионы. $\text{NO}_2^{\cdot}$ сильный одно-электронный окислитель, способный реагировать с широким спектром органических соединений, в том числе нитрировать остатки тирозина и триптофана в белках, а также гуанин в ДНК, участвовать в перекисном окислении липидов [35].

3. Нитрит- (NO_2^-) и нитрат- (NO_3^-) ионы представляют собой продукты окисления монооксида азота. Помимо описанного выше образования нитрит- и нитрат-ионов при гидролизе N_2O_4 , нитраты могут быть синтезированы из нитритов при их дальнейшем окислении в присутствии кислорода. Нитраты могут быть восстановлены до нитритов под действием нитрат-редуктазы, а последующее восстановление нитритов приводит к регенерации NO [36]. Таким образом, нитраты и нитриты являются важными источниками NO в случаях, когда его синтез NO-синтазами ограничен. Кроме того, нитриты взаимодействуют с тиольными группами белков с образованием S-нитрозотиолов, участвуя в регуляции работы цепи переноса электронов (ЦПЭ) митохондрий [37].

Большая часть работ по химии активных форм кислорода и азота (АФКА) сделана в модельных системах, содержащих один тип биомолекул или даже одну единственную молекулу. В клетках и межклеточном пространстве присутствует значительное количество молекул различной природы с той или иной способностью к участию в окислительно-восстановительных реакциях, поэтому важно понимать, какие АФКА целесообразно рассматривать как релевантные в контексте живой системы. Важными факторами при обсуждении реакционной способности являются кинетические характеристики реакции частицы с той или иной молекулой и способность этой частицы к диффузии внутри клетки. К длительному существованию и диффузии внутри клетки на значительные расстояния от мест генерации способны только пероксид водорода (до 1,5 мм) и пероксинитрит (до 50 мкм), тогда как гидроксил-радикал и нитрит-ион действуют более локально при наличии молекул, с которыми они способны реагировать, не имея возможности диффундировать от места генерации [38].

Стоит отметить, что список низкомолекулярных активных форм не ограничивается АФКА и в последнее время активно изучается биологическое значение соединений,

имеющих в своей основе атомы элементов, отличных от кислорода и азота, например, активных форм серы [39–42] или важных для функционирования иммунной системы активных форм хлора и брома [43]. Выделяют также активные карбонильные соединения: формальдегид, глиоксаль, малоновый диальдегид, акролеин и другие, участвующие в регуляции процессов клетки и регуляции экспрессии генов [44]. В реакциях с АФКА участвует карбонат-радикал и его производные, играющие важную роль в окислительно-восстановительных реакциях в клетке [45].

1.2.1 Пути образования активных форм кислорода и азота внутри клетки

АФКА постоянно образуются в клетке как в физиологических условиях, так и в условиях стресса. Так, основным источником $O_2^{\bullet-}$ являются митохондрии, где в процессе окислительного фосфорилирования электроны могут "утекать" из дыхательной цепи и восстанавливать молекулярный кислород. Известно о более чем 11 местах генерации $O_2^{\bullet-}$ в митохондриях [46,47], основными из которых являются следующие:

1) Комплексы дегидрогеназ 2-оксокислот, такие как 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс, пируватдегидрогеназный комплекс, дегидрогеназный комплекс разветвленных 2-оксокислот. Эти комплексы имеют схожее строение и общие компоненты – дигидролипоамиддегидрогеназу (E_3) со связанным флавинадениндинуклеотидом (FAD). Перенос электронов с образованием $FADH_2$ в таких системах происходит поэтапно: перенос одного электрона приводит к образованию семихинона (радикал), перенос второго электрона – к образованию полностью окисленной формы – гидрохинона. При одноэлектронном окислении $FADH_2$ кислородом возможно образование $O_2^{\bullet-}$ и сопряженное с этим процессом образование липоаттильных ($RS^{\bullet}$) радикалов, обладающих большей реакционной способностью, чем $O_2^{\bullet-}$ и образующийся из него H_2O_2 [48].

2) Комплекс I ЦПЭ содержит два места возможной «утечки» электронов: I_F , в котором происходит окисление НАДН с переносом электронов на флавиновую группу и I_Q , в котором восстанавливается убихинон. За счет процессов одноэлектронных переносов электроны могут передаваться на кислород.

3) В комплексе II ЦПЭ также возможна генерация $O_2^{\bullet-}$ при окислении как $FADH_2$, так и убихинона.

4) В комплексе III «утечка» электронов связана с образованием семихиноновой формы убихинона, которая может восстанавливать O_2 до $O_2^{\bullet-}$.

АФК образуются и в других компартментах клетки. Так, трансмембранные ферменты семейства NADPH-оксидаз (NOX1-5, DUOX1-2) участвуют в транспорте электронов через мембрану во внеклеточное пространство, генерируя $O_2^{\cdot-}$ в случае NOX и пероксид водорода в случае DUOX [49]. Ксантиноксидаза и ферменты группы цитохромов P450 также вносят вклад в генерацию $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 [50,51]. H_2O_2 образуется в эндоплазматическом ретикулуме под действием оксидазы ЭПР ERO1, которая окисляет атомы серы дисульфидных связей дисульфид-изомераз белков (PDI) [52].

Супероксид-радикал, образовавшийся в упомянутых реакциях, превращается в пероксид водорода под действием СОД, которая представлена тремя изоформами: митохондриальной (кодируется геном *SOD2*), локализованной в матриксе митохондрий; цитоплазматической (кодируется геном *SOD1*) – в цитоплазме и внеклеточной (кодируется геном *SOD3*) – в межклеточном пространстве [53].

АФА в клетке образуются из NO, который образуется, как было описано выше, под действием NO-синтаз (NOS). Взаимодействие NO с $O_2^{\cdot-}$ приводит к образованию $ONOO^-$, а разложение последнего – к образованию диоксида азота. В условиях стресса клетки происходит активация сигнального пути NF- κ B (ядерный фактор каппа-легкой цепи энхансера активированных В-клеток, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells): активируется индуцибельная NO-синтаза, стимулируя наработку монооксида азота, а образующийся из NO пероксинитрит способствует активации NF- κ B [54,55].

1.3 Антиоксидантные системы клетки

В ходе эволюции в среде, богатой кислородом, аэробные организмы выработали эффективные системы предотвращения окислительных повреждений, которые могут возникнуть под действием АФКА, формирующихся даже в физиологических условиях, и устранения этих повреждений.

Прежде, чем переходить к описанию ферментных и неферментных антиоксидантов, необходимо определить понятие «антиоксидант». В книге *Free Radicals in Biology and Medicine* предлагается такое определение: антиоксидант – любое вещество, которое задерживает, предотвращает или устраняет окислительное повреждение молекулы-мишени [18]. Под молекулой-мишенью здесь может пониматься любое органическое или неорганическое соединение, подверженное окислению в условиях клетки, ткани, организма. Антиоксидантные системы включают в себя группы антиоксидантных ферментов, а также молекулы с малой молекулярной массой.

1.3.1 Антиоксидантные ферменты

Антиоксидантные ферменты катализируют превращение АФКА в менее опасные для клетки соединения. Наиболее важные ферменты представлены супероксиддисмутазами, каталазами, глутатионпероксидазами и пероксиредоксинами [25]:

Супероксиддисмутазы, как уже было отмечено выше, участвуют в преобразовании супероксида в пероксид водорода и представлены тремя типами ферментов [56]:

1. SOD1 – наиболее распространенный тип, присутствующий в цитоплазме, ядре, лизосомах, пероксисомах, межмембранном пространстве митохондрий. Этот фермент представляет собой гомодимер с молекулярной массой 32 кДа. Его ферментативная активность зависит от ионов цинка и меди, причем ионы цинка необходимы только для правильного фолдинга белка и могут быть заменены на ионы кобальта или меди, в отличие от участвующих в катализе ионов меди.

2. SOD2, локализованная в матриксе митохондрий, является гомотетрамером с молекулярной массой 96 кДа. В качестве кофактора в ферментах этого типа используется ион марганца.

3. SOD3 – внеклеточная супероксиддисмутаза, гомотетрамер с молекулярной массой 135 кДа. Как и SOD1, в качестве кофакторов использует ионы меди и цинка.

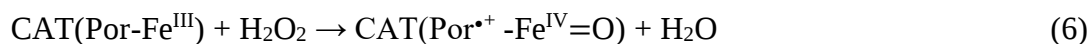
Супероксиддисмутазы катализируют диспропорционирование супероксид-радикала по механизму, который в литературе называют «пинг-понг»: в начале каталитического цикла электрон с супероксида переносится на окисленный ион металла с образованием молекулярного триплетного кислорода, на второй стадии окисленный ион передает этот электрон на второй супероксид с образованием пероксида водорода [57]. В результате из двух супероксид-радикалов при участии двух протонов образуются пероксид водорода и молекулярный кислород (реакции 4-5).



Каталаза (CAT) участвует в нейтрализации пероксида водорода, в том числе образованного в реакциях, катализируемых супероксиддисмутазами. Каталаза клеток человека представляет собой гомотетрамер, содержащий 4 гема, с молекулярной массой 240 кДа [58]. В клетках основной пул каталазы содержится в пероксисомах, но фермент может экспортироваться в цитоплазму в условиях накопления АФК в клетке [59].

Предполагается, что в онкотрансформированных клетках каталаза может присутствовать на мембране клетки [60], но это предположение спорно [61].

Первая стадия процесса, катализируемого каталазой, включает в себя окисление гема пероксидом водорода с образованием порфиринового катион-радикала и воды (реакция 6), реакция этого комплекса со второй молекулой пероксида водорода приводит к восстановлению железа в составе комплекса с образованием кислорода и воды (реакция 7) [62].



Каталаза способна катализировать реакции не только с участием пероксида водорода, но и пероксинитрита. Кроме того, радикальный комплекс, формирующийся на первой стадии реакции, может окислять моноксид азота, однако каталаза в исходном состоянии обратимо ингибируется NO, а также синглетным кислородом, карбонат-радикалом, гидроксил-радикалом и супероксидом [63].

Глутатионпероксидазы (GPXs) – семейство ферментов, катализирующих восстановление пероксида водорода и органических пероксидов глутатионом с образованием воды или спиртов (Рисунки 2, 3).

К этому семейству относят 8 ферментов: GPX1-8, из которых GPX1-4 и GPX6 содержат в активном центре селеноцистеин [64]. Экспрессия большинства глутатионпероксидаз тканеспецифична. GPX1 экспрессируется в большинстве тканей и присутствует в цитоплазме и митохондриях клеток. GPX4 защищает мембраны клеток от окисления и может катализировать восстановление пероксидов фосфолипидов, холестерина и его эфиров, предотвращая гибель клеток по пути ферроптоза [65]. Недавно открытые GPX7 и GPX8 не содержат доменов для связывания глутатиона, а в их активном центре присутствует цистеин [66]. Несмотря на это, эти ферменты способны восстанавливать пероксид водорода до воды. Они присутствуют в эндоплазматическом ретикулуме клеток и участвуют в окислительном фолдинге белков, выполняя функции оксидаз дисульфид-изомераз белков [67].

Каталитический цикл глутатионпероксидаз включает в себя три стадии [68]: 1) остаток селеноцистеина окисляется под действием пероксида с образованием воды; 2) окисленный остаток реагирует с глутатионом, образуя дисульфидную связь между ферментом и глутатионом; 3) нуклеофильная атака второй молекулы глутатиона приводит

к формированию окисленного глутатиона (дисульфида) и восстановлению исходного состояния фермента (Рисунок 2).

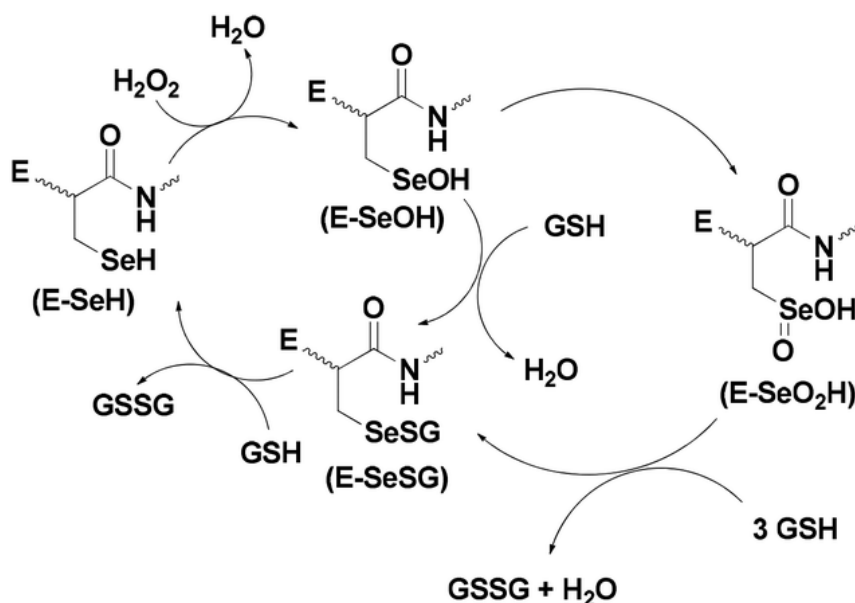


Рисунок 2 – Каталитический цикл глутатионпероксидаз, GSH – восстановленная форма глутаиона GSSG – окисленная форма глутатиона, E – глутатионпероксидаза [68].

Окисленный глутатион далее восстанавливается при помощи NADPH-зависимых глутатионредуктаз [69].

Другое семейство ферментов, способных восстанавливать молекулы содержащие пероксидные группы, представлено пероксиредоксинами (PRDX). В клетках человека экспрессируется 6 пероксиредоксинов (PRDX1-6), уровень экспрессии этих ферментов варьирует в зависимости от типа ткани и клеток [70], также наблюдается специфичность локализации в определенных органеллах клетки для некоторых представителей семейства. Восстановление пероксидов в активном центре происходит за счет наличия остатков цистеина. Пероксиредоксины классифицируют по числу и функциям этих остатков [71]: 1) типичные 2-Cys пероксиредоксины содержат 2 остатка цистеина, принадлежащих разным субъединицам фермента, при этом один из цистеинов участвует в восстановлении пероксидов, переходя в форму сульфеновой кислоты ($R\text{-SOH}$), второй остаток восстанавливает первый, формируя дисульфидную связь между субъединицами, которая может быть восстановлена другими ферментами, например, тиоредоксинами; 2) в атипичных 2-Cys пероксиредоксинах цистеины активного центра принадлежат одной субъединице фермента; 3) пероксиредоксин 6 относится к группе 1-Cys ферментов, которым для восстановления остатка цистеина необходим глутатион. Субстратами для

пероксиредоксинов могут являться пероксид водорода, органические пероксиды, пероксиды липидов, а также пероксинитрит [72,73].

Дисульфидные связи пероксиредоксинов, а также других белков, могут быть восстановлены тиоредоксинами (TXN). Тиоредоксины – антиоксидантные ферменты, выполняющие роль редуктаз дисульфидных связей. Это небольшие белки с массой около 12 кДа, содержащие два цистеина в активном центре. Геномом человека кодируются 2 тиоредоксина: TXN, TXN2, которые экспрессируются во всех тканях, при этом TXN – преимущественно цитоплазматический белок, тогда как TXN2 – митохондриальный [74–76]. Тиоредоксины восстанавливают дисульфидные связи за счет нуклеофильной атаки дисульфидной связи белка-субстрата атомом серы одного из цистеинов фермента с образованием дисульфидной связи между тиоредоксином и белком-субстратом. Далее происходит нуклеофильная атака атома серы второго остатка цистеина тиоредоксина с образованием дисульфидной связи между остатками [77]. Окисленные тиоредоксины восстанавливаются NADPH-зависимыми тиоредоксин-редуктазами. Тиоредоксины могут участвовать в сигнальных путях клетки за счет регуляции активности транскрипционных факторов путем восстановления окисленных цистеинов и дисульфидных связей в белках комплекса AP-1, NF-kB, Ref-1, HIF1A [78].

1.3.2 Низкомолекулярные антиоксиданты

Наряду с антиоксидантными ферментами в клетках присутствуют низкомолекулярные соединения, способные предотвращать окислительные повреждения биомолекул за счет нейтрализации АФКА. Эта группа антиоксидантов включает в себя как гидрофильные, так и гидрофобные соединения. К наиболее изученным гидрофильным антиоксидантам относятся аскорбиновая кислота, глутатион и полифенольные соединения, включая флавоноиды, к гидрофобным – каротиноиды, α -токоферол и кофермент Q10 [25]. Глутатион и кофермент Q10 являются продуктами метаболизма самой клетки, вклад остальных перечисленных молекул в антиоксидантную защиту клеток может быть оценен только при поступлении их извне: в случае организма – с пищей, в случае культуры клеток – в составе культуральной среды.

Несмотря на то, что основной защитой клеток от АФКА являются ферментные системы, некоторые АФКА реагируют с малыми молекулами с сопоставимыми скоростями, так, константы скорости взаимодействия аскорбиновой кислоты с супероксид-радикалом, пероксинитритом и пероксидами липидов составляют 3×10^5 , 10^2 и $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ соответственно [79]. Для реакции α -токоферола, который за счет своей липофильности может

присутствовать в мембранах клеток, с органическими пероксидами и синглетным кислородом константы скорости превышают $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [79].

1.4 Окислительный стресс

Как было отмечено ранее, накопление АФКА в клетке и во внеклеточном пространстве до уровней, которые не могут быть эффективно нейтрализованы антиоксидантными системами клетки, может приводить к повреждениям биомолекул. Это состояние получило название «окислительный стресс», первоначальное определение которого звучало как «дисбаланс между уровнями окислителей и антиоксидантов, с преобладанием окислителей, ведущий к нарушению передачи сигналов посредством окислительно-восстановительных реакций и /или повреждению молекул» [80]. По мере развития исследований в области окислительно-восстановительных процессов в клетках и организмах стало понятно, что многие АФКА участвуют в физиологических процессах и передаче сигналов в клетке. Состояние, при котором наблюдается накопление АФКА, воздействующих на специфические целевые молекулы в клетке, в концентрациях до нескольких десятков нМ вследствие физиологических процессов, стали называть окислительным эустрессом [81]. Накопление АФКА до концентраций от сотен нМ до мМ с повреждением неспецифических биомолекул называют окислительным дистрессом [82]. Окислительный дистресс может быть результатом либо снижения концентрации или активности антиоксидантов, либо более интенсивного образования АФКА, в том числе вторичных АФКА, формирующихся как побочные продукты клеточных процессов [18].

Несмотря на сформировавшуюся к настоящему моменту терминологию, в литературе понятие «окислительный стресс» чаще используется в значении «окислительный дистресс». Далее по тексту этот термин также будет использоваться с этим значением, если не оговорено иное.

1.5 Методы качественного и количественного определения активных форм кислорода и азота

Исследование биологических эффектов АФКА и их нейтрализации системами клетки или экзогенными антиоксидантами требует применения методов качественного и количественного определения АФКА в клетках, биологических жидкостях и тканях.

Рассмотрим самые распространённые методы определения АФКА:

1) Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) позволяет качественно или количественно определять отдельные соединения радикальной природы в биологических образцах. В этом методе используются специальные вещества – спиновые ловушки – диамагнитные соединения, которые окисляются АФКА с образованием более стабильных радикалов, имеющих характерные спектры ЭПР. Так, для анализа синглетного кислорода используют 2,2,6,6-тетраметилпиперидин (ТЕМР), который, взаимодействуя с $^1\text{O}_2$, образует радикал 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил (ТЕМРО) (Рисунок 3А) [83]. Для детекции супероксид-радикала и гидроксил-радикала используют 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид (DMPO) и его производные, аддукты которых с АФК (Рисунок 3Б) детектируются спектрометром [84].

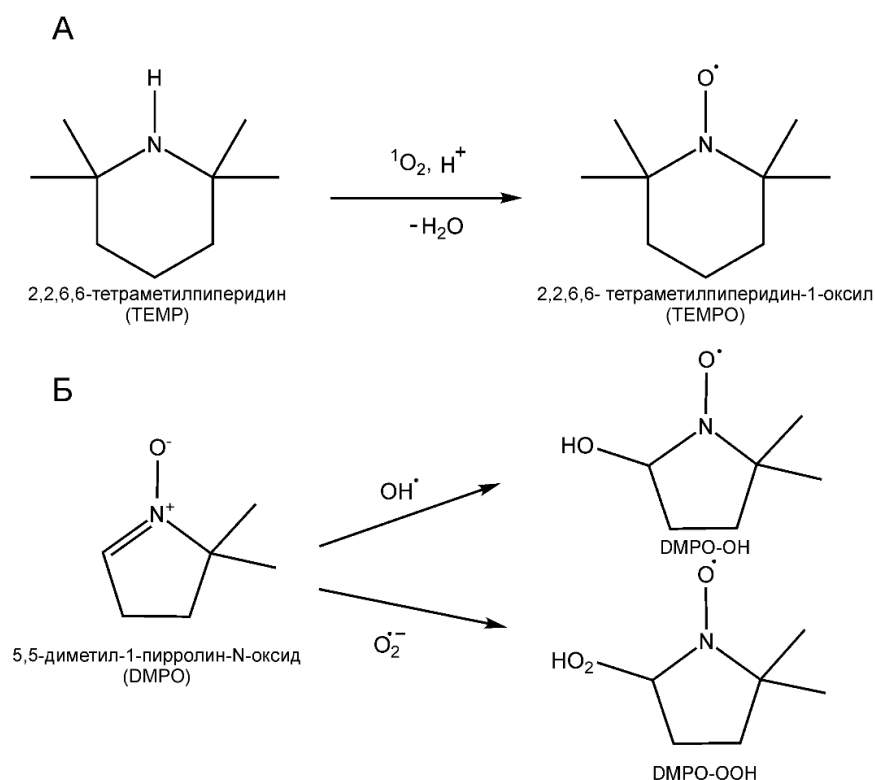


Рисунок 3 – Образование аддуктов спиновых ловушек с активными формами кислорода: А – 2,2,6,6-тетраметилпиперидина с синглетным кислородом, Б – 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксида с гидроксил-радикалом и супероксид-радикалом.

2) Флуоресцентные подходы отличаются широким разнообразием методов детекции. В качестве субстратов для определения АФКА широко используются дигидроэтидий (2,7-Диамино-10-этил-9-фенил-9,10-дигидрофенантридин), 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин, 10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин (коммерческое название Amplex Red) и их производные, а также флуоресцентные сенсоры белковой

природы. Первые два красителя используют для неспецифической полуколичественной оценки содержания АФКА в клетке.

Так, дигидроэтидий часто используют в качестве сенсора для определения $O_2^{\cdot-}$, взаимодействуя с которым, он превращается в 2-гидроксиэтидий – специфический флуоресцирующий продукт (Рисунок 4), однако под действием других окислителей может формировать этидий – неспецифический, но также флуоресцирующий продукт, причем спектры флуоресценции этих соединений перекрываются, не давая возможности отслеживать содержание только $O_2^{\cdot-}$ [85].

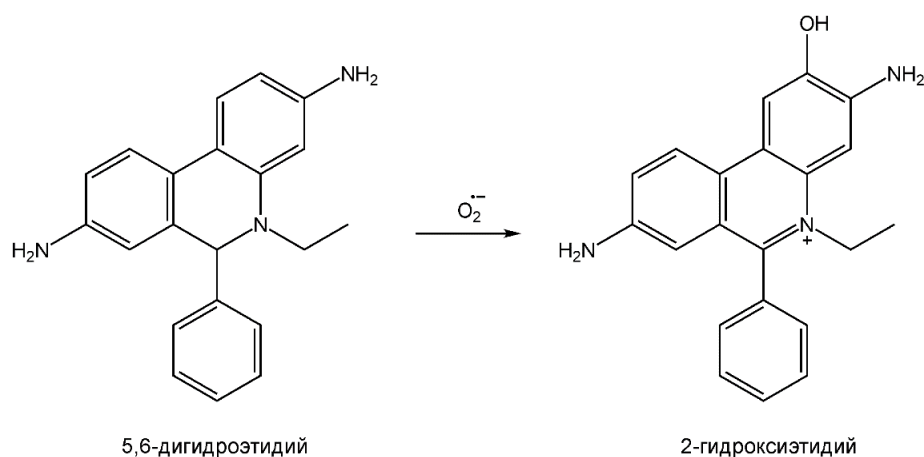


Рисунок 4 – Схема реакции дигидроэтидия с супероксид-радикалом

Использование этого метода совместно с высокоэффективной жидкостной хроматографией позволяет разделить продукты окисления и анализировать уровень только супероксид-радикала [86].

2',7'-Дихлородигидрофлуоресцеин используют в форме диацетата, который быстро проникает в клетки и подвергается деацетилированию с образованием не проникающего через мембрану 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина, и дальнейшему окислению до флуоресцирующего 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCF), способного проникать через мембрану (Рисунок 5).

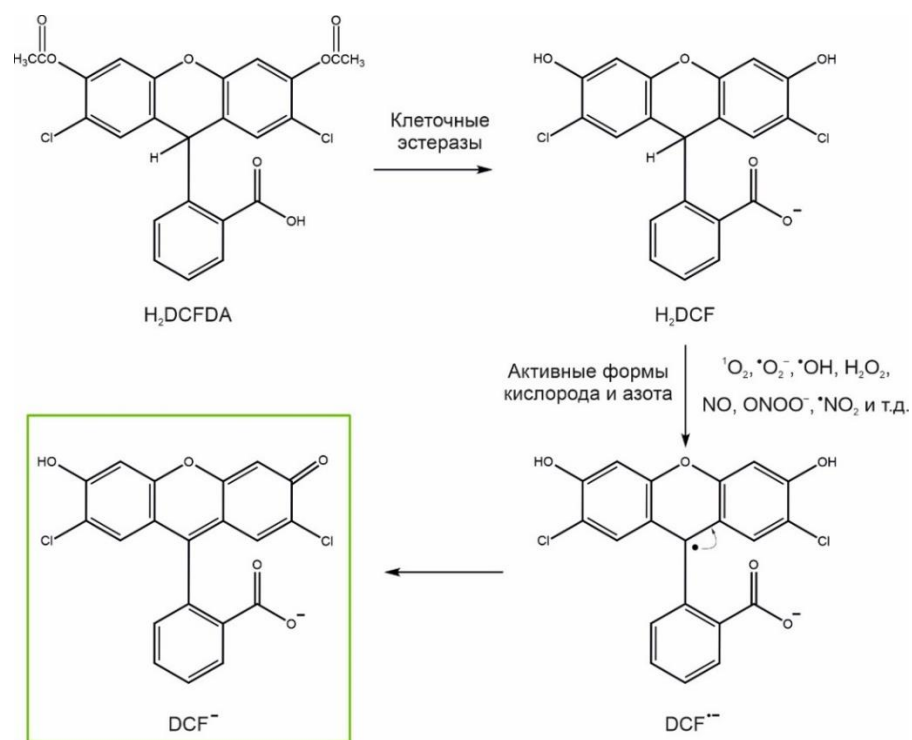


Рисунок 5 – Образование флуоресцирующего 2',7'-дихлорофлуоресцеина из диацетата 2',7'-дихлороди гидрофлуоресцеина

H₂DCF не окисляется H₂O₂ и O₂^{•-}, но окисляется пероксил-, алкоксил-, гидроксил-, карбонат-радикалами, а также радикалами NO₂[•] и ONOO⁻, поэтому используется как сенсор общего окислительного стресса клетки, а не отдельных соединений, приводящих к этому стрессу (Рисунок 6) [87].

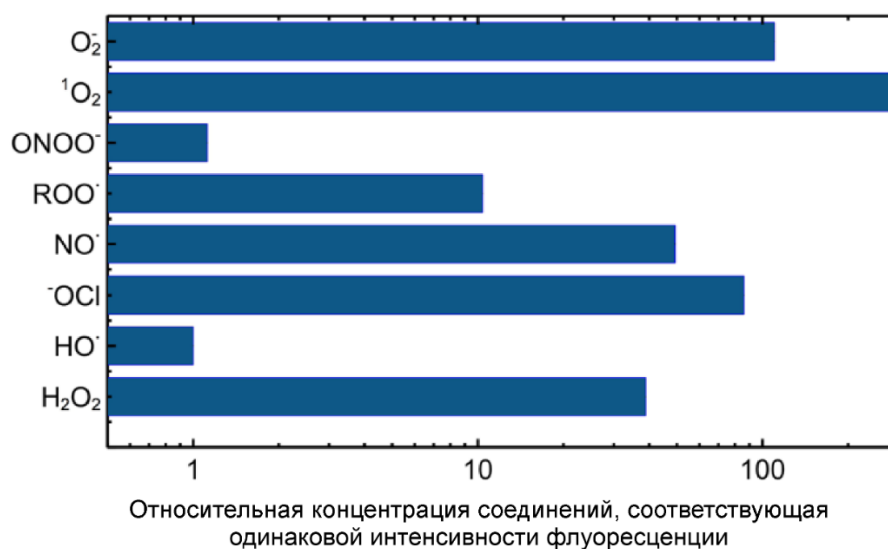


Рисунок 6 – Относительная реакционная способность АФКА с диацетатом 2',7'-дихлороди гидрофлуоресцеина [88].

Кроме того, необходимо учитывать светочувствительность реагента, поскольку показано, что воздействие видимым светом на клетки, инкубируемые в присутствии $\text{H}_2\text{DCF-DA}$, приводит к амплификации сигнала за счет образования радикала $\text{DCF}^\bullet$, который может окислять гидрированную форму [89]. Эту особенность можно использовать для усиления сигнала в случае наличия слабо флуоресцирующих образцов, обрабатывая все образцы одинаковой дозой света, при этом не меняются относительные величины флуоресценции между образцами [89].

Для определения концентрации внутри- и внеклеточного H_2O_2 используют коммерчески доступный реагент Amplex Red, окисление которого пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена приводит к образованию флуоресцирующего резорурфина (Рисунок 7) [90].

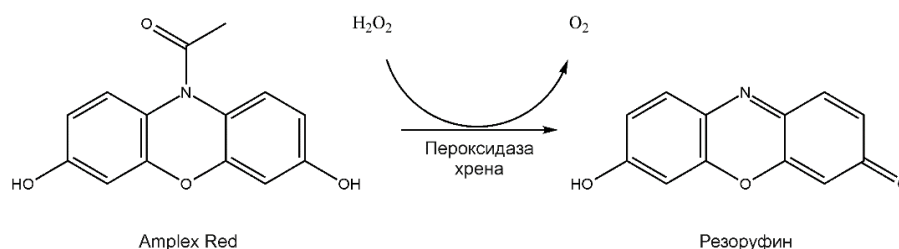


Рисунок 7 – Схема окисления реагента Amplex Red (10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазина) пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена.

У этого метода, однако, есть значительные ограничения [91]. Так, образование резорурфина может стимулироваться не только H_2O_2 , но и ONOO^- . Кроме того, в некоторых тканях и культурах клеток превращение Amplex Red в резорурфин может катализироваться карбоксилэстеразой без пероксида водорода, пероксидазы хрена или кислорода. Считается, что наиболее селективным подходом к определению пероксида водорода в клетках и тканях является использование флуоресцентных белков, которые содержат восстановленные цистеины, окисляемые пероксидом водорода, что сопровождается усилением флуоресценции [92].

3) Спектрофотометрические методы применяются для детекции $\text{O}_2^{\bullet-}$, NO_2^- и NO_3^- .

Распространенный метод определения содержания $\text{O}_2^{\bullet-}$ – восстановление железа в составе цитохрома С. Для восстановленной формы наблюдается максимум поглощения света в районе 550 нм. Цитохром С может также подвергаться восстановлению другими восстановителями: аскорбатом, глутатионом, ксантин оксидазой, а пероксид водорода и пероксинитрит могут, наоборот, окислять восстановленный цитохром и тем самым влиять

на результаты анализа. Необходимо использовать подходящие контроли, а также нейтрализовать по возможности влияние перечисленных соединений [91].

Для определения концентраций NO_2^- и NO_3^- – важных производных монооксида азота – используют метод Грисса, основанный на реакции диазотирования в кислых условиях между нитрит-ионом и сульфаниламидом, которая протекает с образованием катиона диазония [93]. Последний реагирует с N-(1-нафтил)этилендиамином (NED), образуя азо-производное, интенсивность поглощения света с длиной волны 540 нм которого пропорциональна концентрации NO_2^- (Рисунок 8). При этом в реакцию диазотирования вступает не сам нитрит-ион, а триоксид азота (N_2O_3), образующийся при его протонировании. N_2O_3 , кроме того, является продуктом реакции монооксида азота с диоксидом азота, а также продуктом окисления монооксида азота молекулярным кислородом [94].

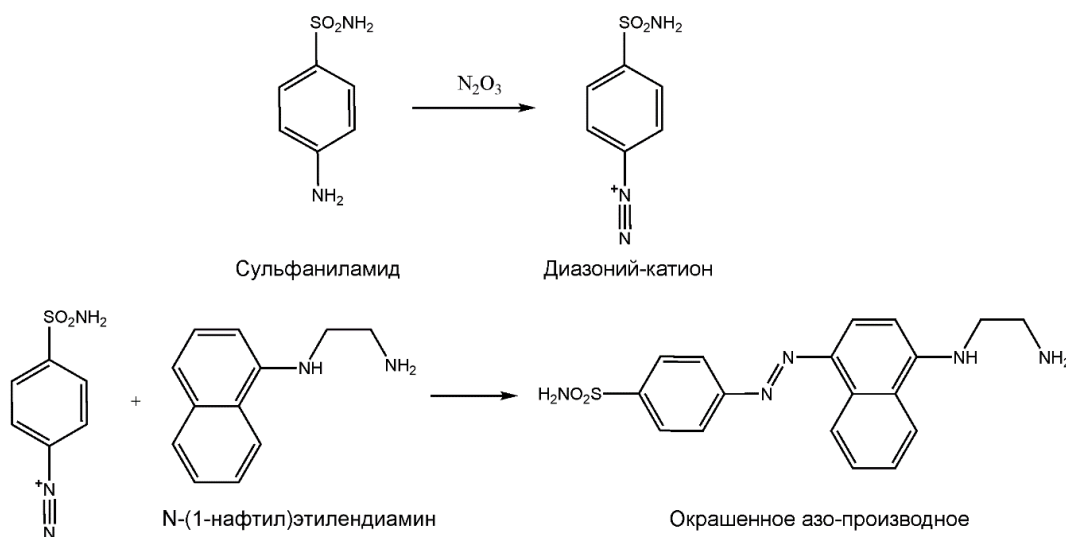


Рисунок 8 – Схема образования окрашенного азопроизводного при определении нитрит-ионов методом Грисса

Использование классического метода Грисса позволяет определять концентрацию нитрит-ионов в биологических жидкостях, а также в культуральной среде, при этом необходимо внимательно подходить к анализу стандартных растворов, которые должны быть приготовлены в таких же по составу растворах, что и экспериментальные образцы [95].

4) Электрохимические методы возможно применять для детекции $\text{O}_2^{\cdot -}$, $\text{HO}^{\cdot}$, а также H_2O_2 в биологических жидкостях и культуральной среде [96]. Так, для определения концентрации $\text{O}_2^{\cdot -}$ в культуральной среде описано использование как ферментных

сенсоров, так и сенсоров на основе наноматериалов, нижний предел чувствительности метода при этом составлял порядка 10^{-10} М [97]. Для определения образования $\text{HO}^\bullet$ и его количественного определения предложены сенсоры на основе наночастиц золота, конъюгированных с ДНК [98]. В последние годы предпринимаются попытки электрохимического определения АФКА внутри клеток, однако эти методы еще далеки от широкого внедрения в лабораторную практику [99].

1.6 Активные формы кислорода и азота, генерируемые в потоке холодной плазмы, их взаимодействия между собой и с компонентами окружающей среды.

АФКА генерируются во внеклеточном пространстве и в клетках при действии некоторых известных химиопрепаратов. Например, обработка клеток и опухолей гемцитабином, препаратами, содержащими платину, антрациклинами, приводит к увеличению внутриклеточного уровня АФКА [25]. Ионизирующее излучение, используемое в терапии онкологических заболеваний, приводит к радиолизу молекул воды с образованием гидроксил-радикалов и гидратированных электронов, которые стимулируют образование более стабильных АФКА [100]. Кроме того, применение фотодинамической терапии также приводит к увеличению содержания внутриклеточных АФКА, что коррелирует с восстановлением чувствительности клеток, резистентных к действию препаратов химиотерапии, к этим препаратам [101].

1.6.1 Процессы, приводящие в генерации АФКА в потоке плазмы

Описание генерации АФКА в потоке плазмы необходимо начать с рассмотрения процессов, происходящих при приложении напряжения к проходящему через газоразрядную камеру газу [88]:

- приложение электрического поля ускоряет свободные электроны в составе газа. Электроны передают энергию атомам посредством неэластичных столкновений и молекулам посредством вибрационного возбуждения. При столкновении электронов с высокой энергией с атомами гелия возможен переход атомов в возбужденные метастабильные состояния, которые затем способны ионизировать другие атомы и молекулы (эффект Пеннинга) [102].

- Столкновения электронов с высокой энергией с атомами и/или молекулами газа приводят к их ионизации и высвобождению еще большего количества свободных электронов – Таунсендовский разряд.

- При превышении прикладываемым напряжением порогового значения напряжения разряда газа, которое определяется типом газа, давлением и расстоянием между электродами, на границе питающего электрода инициируется газовый разряд.

- Разряд распространяется в направлении заземленного электрода, отделенного слоем диэлектрика, формируются области концентрации заряженных частиц, которые ионизируют атомы/молекулы впереди по пути распространения – так называемые стримеры. Распространение стримеров за пределы камеры возможно только в присутствии в окружающей среде, на фронте стримера, электроотрицательного газа, которым чаще всего является кислород. Причем это распространение не хаотично и совпадает с потоком рабочего инертного газа, так как его напряжение разряда ниже, чем у окружающего воздуха.

В ходе описанных процессов в потоке плазмы генерируются возбужденные атомы гелия и молекулы азота, атомарный кислород, в ходе реакций этих частиц друг с другом и с другими присутствующими в воздухе молекулами образуются монооксид и диоксид азота, озон, пероксид водорода и другие АФКА [103].

Состав активных форм кислорода и азота, образующихся в потоке плазмы, зависит от параметров разряда, геометрии источника, состава рабочего газа, а также от состава окружающего воздуха. Для изучения и контроля состава потока плазмы используют методы оптической эмиссионной спектроскопии, а также оптической абсорбционной спектроскопии. Для изучения химических реакций, происходящих в газоразрядной камере, обычно применяют математическое моделирование. Состав потока плазмы, используемой в экспериментальной части данной работы, описан в приложении А.

Важную роль в определении состава АФКА в потоке плазменной струи играют параметры газового разряда: тип и амплитуда напряжения, а также частота. В зависимости от установки амплитуда напряжения может варьировать от сотен вольт до нескольких десятков киловольт, а частота – от нескольких килогерц до нескольких гигагерц. Выбор тех или иных параметров зависит от области применения источника, допустимой температуры потока, конфигурации электродов и т.п.

В генераторах плазмы не используют постоянный ток, а переменный ток генерируется либо синусоидальным, либо импульсным напряжением. Выбор переменного тока обусловлен необходимостью контроля за температурой источника, использование такого напряжения позволяет избежать установления равновесия между энергиями электронов и крупных частиц, поддерживается невысокая температура потока плазмы [88].

Исходя из теоретических оснований, рост амплитуды напряжения должен приводить к увеличению напряженности электрического поля, что будет соответствовать увеличению

энергии заряженных частиц и более активной генерации АФКА. Увеличение частоты должно приводить к повышению концентрации электронов, увеличивая скорости реакций с их участием. Экспериментально влияние амплитуды напряжения и частоты на генерацию АФКА изучали на примере плазменной струи в аргоне Кун Лю с соавторами [104]. Авторы анализировали параметры при сохранении постоянной входной мощности и конфигурации электродов, в таких условиях при увеличении частоты напряжение будет уменьшаться. Показано, что увеличение частоты приводит к снижению температуры газа, а также концентрации гидроксил-радикалов в потоке плазмы, тогда как концентрация молекул озона увеличивается с ростом частоты. Авторы отмечают, что концентрация электронов зависит от входной мощности и поэтому остается постоянной в их экспериментах.

Скорость потока газа влияет на величину напряжения, при котором в газе постоянного состава инициируется разряд: при увеличении скорости потока газа напряжение снижается [105]. При этом, повышение скорости газа позволяет значительно уменьшить диффузию окружающего воздуха в газоразрядную камеру, что благоприятно сказывается на стабильности работы установки [105].

Один из наиболее важных параметров при генерации плазмы – состав рабочего газа. Показано, что при добавлении к аргону 0,1-1% азота плотность электронов снижается на порядок, при этом образование диоксида азота, а также плотность этих молекул в потоке плазмы ускоряется более, чем в два раза [106]. Добавление 0,1-1% кислорода приводит к увеличению скорости образования и плотности молекул озона более, чем в 4 раза [106]. Увеличение концентрации гидроксил-радикалов в потоке плазмы в аргоне можно достичь повышением влажности окружающего воздуха [107,108]. Характеристики струи плазмы в гелии также меняются при добавлении азота и кислорода. Так, использование примесей азота и кислорода в пределах 0,1-1% увеличивают напряжение разряда, уменьшают длину струи плазмы за счет снижения количества электронов с высокой энергией, кроме того, снижается температура электронов [109], что приводит к изменению состава потока плазмы.

1.6.2 Взаимодействия АФКА на поверхности раздела газ/жидкость и химические реакции в жидкости

Большинство применений холодной плазмы *in vitro*, а также ряд применений *in vivo* включают в себя взаимодействие потока плазмы с жидкостью. Часть образующихся в газовой фазе АФКА, особенно частицы с продолжительным временем существования, могут переходить в жидкую фазу, не вступая в химические реакции, более

реакционноспособные частицы взаимодействуют как с молекулами растворителя, так и с компонентами раствора [110]. Молекулы жидкости под действием потока газа могут переходить в газовую фазу с последующими реакциями с образованными АФКА. Испарение воды приводит к более интенсивному образованию гидроксил-радикалов, как было описано выше. Растворение оксидов азота приводит к формированию нитрит- и нитрат-ионов в водной фазе [111].

Для холодной плазмы в гелии показано, что в воде и культуральной среде после обработки происходит дозозависимое накопление гидроксил-радикалов, супероксид-радикалов, а также пероксида водорода [112]. Причем концентрация H_2O_2 , в отличие от $\bullet\text{OH}$ и O_2^- , не зависит от типа раствора, ее накопление происходит эффективно как в воде, так и в культуральной среде без сыворотки, так и в среде с добавлением сыворотки. Концентрация превышает 1 мМ при длительной обработке. Синглетный кислород полностью нейтрализуется компонентами среды. Авторы также оценили концентрацию нитрит- и нитрат-ионов в воде и среде после обработки плазмой: наблюдали повышение концентрации нитрит-ионов при переходе от воды к среде без сыворотки и, далее, к среде с сывороткой. Нитрат-ионы детектировали только в воде и среде без сыворотки и только при длительной обработке.

Интересные закономерности превращений АФКА в культуральной среде выявили Сарделла с соавторами [113]. Авторы показали, что $\text{NO}\bullet$ детектируется в обработанной плазмой воде, но не в культуральной среде. Они предложили механизм нейтрализации монооксида азота продуктами окисления глюкозы, присутствующей в высокой концентрации в среде, а также предположили, основываясь на данных с раствором цистеина, что тио-группа может служить формой запасаения этой АФА, в том числе переносить $\text{NO}\bullet$ внутрь клеток. В экспериментах с разными рабочими газами: кислородом, азотом и с воздухом с контролируемым составом, ими была продемонстрирована возможность регулировать концентрации образующихся в среде нитрит-ионов и пероксида водорода, а также было показано синергическое действие этих двух частиц в цитотоксическом эффекте на опухолевые клетки в культуре.

1.7 Молекулярный механизм ответа опухолевых клеток на обработку холодной плазмой

Активные формы кислорода и азота, генерируемые в потоке холодной плазмы и в жидкостях, подвергающимся обработке плазмой, могут оказывать на эукариотические

клетки широкий спектр воздействий. Так, показано, что низкие дозы АФКА могут стимулировать заживление ран за счет противомикробного действия, а также за счет стимуляции пролиферации клеток кожи [114]. Эти свойства лежат в основе применения холодной плазмы в дерматологии, где она может быть использована для обеззараживания раневой поверхности и ускорения процесса заживления, в том числе хронических ран [115–117].

В контексте данной работы обсуждаются противоопухолевые свойства холодной плазмы, поэтому важно рассмотреть биологические процессы и сигнальные пути, которые участвуют в ответе клеток на высокие дозы генерируемых плазмой АФКА. При этом стоит отметить, что в исследованиях противоопухолевых эффектов плазмы необходим корректный подбор дозы обработки, так как невысокие дозы АФКА могут стимулировать рост опухолевых клеток и ангиогенез опухолей [118]. Рассмотрим основные сигнальные пути, которые могут активироваться в клетке в ответ на накопление АФКА.

1.7.1 Сигнальные пути, активируемые в клетке в ответ на накопление АФКА и окислительный стресс

Одним из транскрипционных факторов, выполняющих функцию сенсора АФКА, является фактор NFE2L2 (NRF2). В условиях нормального гомеостаза клетки этот белок присутствует в цитоплазме в комплексе с белком KEAP1, который регулирует убиквитинирование NRF2 E3-убиквитинлигазой Cul3 и дальнейшую деградацию в протеасомах [119]. При действии окислителей, в том числе АФКА, в KEAP1 формируются две дисульфидные связи, изменяющие конформацию молекулы и высвобождающие NRF2 из комплекса [120]. NRF2 в свободном состоянии накапливается в цитоплазме и транслоцируется в ядро, где формирует гетеродимеры с белками Maf и связывается с последовательностями ARE (antioxidant response elements) в регуляторных участках генов, функции которых связаны с ответом на окислительный стресс. Среди этих генов гены супероксиддисмутаза, каталазы, гем-оксигеназы, тиоредоксинов, пероксиредоксинов, глутатион трансфераз, редуктаз и пероксидаз, и ген самого транскрипционного фактора (Рисунок 9) [121].

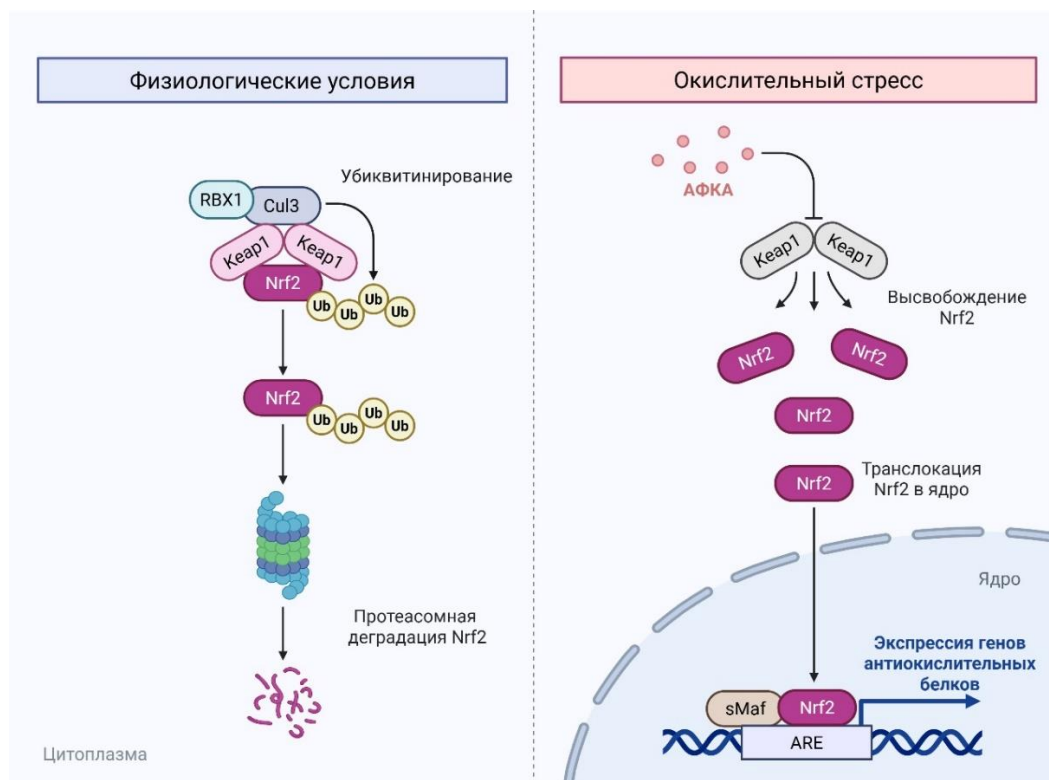


Рисунок 9 – Метаболизм транскрипционного фактора Nrf2 в физиологических условиях и в условиях окислительного стресса. Рисунок подготовлен с использованием шаблона сайта biorender.com [122]

Кроме того, NRF2 может участвовать в регуляции биологических процессов, связанных с ответом клетки на окислительный стресс, вместе с другими белками. Например, NRF2 участвует в ответе на накопление белков с нарушенной структурой [121]:

- NRF2 активирует транскрипцию транскрипционного фактора ATF4, в комплексе с которым может стимулировать экспрессию генов.
- Накопление несвернутых белков и их агрегация в ЭПР приводит к образованию избыточного количества АФКА в митохондриях и ЭПР и их высвобождению в цитоплазму, где они могут активировать NRF2.
- Активированная вследствие стресса ЭПР киназа PERK может фосфорилировать NRF2, что также приводит к разрушению комплекса с KEAP1 и Cul3.

NRF2 также активирует экспрессию генов, участвующих в аутофагии: *ULK1*, *SQSTM1*, *CALCOCO2*, *ATG4D*, *ATG7*, *GABARAPL1*, *ATG2B*, *ATG5*, *ATG4D* [123].

Кроме того, формируя комплекс с NRF2, с ARE могут связываться и другие транскрипционные факторы: белки семейства Jun, c-Fos, Fra, PMF-1, что значительно расширяет спектр регулируемых генов [124].

Другое важное семейство белков, участвующих в ответе клеток на окислительный стресс, – AP-1, включает в себя транскрипционные факторы нескольких подсемейств: Jun(c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2), Maf (c-Maf, MafA, MafB, MafG/F/K, Nrl) and ATF (ATF2, ATF3, ATF4, BATF3) [125]. Эти белки формируют гетеро- и гомодимеры и связываются со специфическими регуляторными последовательностями в промоторах целевых генов [126]. Активация белков семейства AP-1 может происходить под действием широкого спектра стимулов, в том числе УФ-излучения и АФКА. Так, известно, что экспрессия генов и уровень белков c-Fos и c-Jun увеличиваются при действии на клетки экзогенных АФКА, в частности монооксида азота и пероксида водорода [127]. Транскрипционные факторы этого семейства, в частности, регулируют пролиферацию клеток за счет активации/подавления экспрессии генов, участвующих в прогрессии клеточного цикла, причем характер регуляции зависит от комбинации белков в гомо- или гетеродимере [128]. ДНК-связывающая активность димеров c-Fos и c-Jun определяется окисленным или восстановленным состоянием цистеинов в ДНК-связывающих доменах этих факторов [129]. АФКА могут также опосредованно активировать белки этого семейства посредством фосфорилирования в каскаде реакций, катализируемых митоген-активируемыми киназами (mitogen-activated protein kinase, MAPK) [130].

Белки, принадлежащие к семейству MAP-киназ участвуют не только в активации факторов семейства AP-1, но и самостоятельно выполняют регуляторные функции в состоянии окислительного стресса клетки. Это семейство киназ участвует в регуляции четырех основных сигнальных путей: ERK-1/2, p38 MAPK, JNK, ERK-5, при этом p38 MAPK и JNK вовлечены в ответ на стресс и регуляцию апоптоза, а ERK пути участвуют в стимуляции/ингибировании пролиферации и дифференцировки клеток [131]. Эти сигнальные каскады активируются при связывании лигандов с трансмембранными рецепторными тирозин-киназами (RTK), такими как EGFR, FGFR, PDGFR, VEGFR, однако возможны и лиганд-независимые варианты активации этих каскадов [132]. Кроме того, для EGFR показана активация передачи сигналов при окислении пероксидом водорода цистеина в киназном внутриклеточном домене рецептора [133]. Далее происходит активация киназ киназ MAP-киназ (MAPKKK), которые фосфорилируют киназы MAP-киназ (MAPKK), фосфорилирующие MAP-киназы. MAP-киназы активируют транскрипционные факторы и тем самым регулируют экспрессию генов [134]. При окислительном стрессе активация каскадов JNK и p38 может происходить по рецептор-независимому пути [135]: киназа 1, регулирующая сигналы апоптоза (apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1), выполняющая роль MAPKKK, в виде олигомера формирует

крупный сигнальный комплекс с восстановленными тиоредоксинами, которые ингибируют киназную активность ASK1 за счет предотвращения взаимодействия мономеров между собой. Окисленные АФКА тиоредоксины диссоциируют из комплекса, к которому привлекаются белки семейства TRAF – формируется активный комплекс, способный к аутофосфорилированию и, далее, к активации MAPKK. Реакции последовательного фосфорилирования приводят, в конечном итоге, к активации MAPK. Фосфорилированная форма JNK активирует транскрипционные факторы семейства AP-1, ATF2, c-Мус, p53, Elk1, STAT1/3, SMAD4, а также белки-регуляторы апоптоза семейства Bcl-2 [136]. Фосфорилированная форма киназы p38 напрямую или через опосредованные пути регулирует активность большого количества транскрипционных факторов: p53, STAT, CREB, BRN2, NF-kB, NLF, а также регуляторных белков: циклинов и ингибиторов циклин-зависимых киназ, GADD45A, Beclin и Drosha [137]. Стоит отметить, что процессы, которые стимулируются активированными MAPK, определяются не только фосфорилированными генами, но и молекулярным «контекстом», в котором происходит эта активация. Так, фосфорилирование JNK и p38 может приводить как к индукции экспрессии про-апоптотических, так и анти-апоптотических генов, характер регуляции апоптоза зависит от продолжительности иницирующего воздействия, его силы, а также от активности других сигнальных путей, которые регулируют тот же процесс [138].

Важным регулятором ответа на широкий спектр стрессов клетки является транскрипционный фактор p53, кодируемый геном *TP53*. В физиологических условиях p53 имеет небольшое время жизни и направляется на протеасомную деградацию за счет убиквитинирования убиквитин-лигазами MDM2 или MDM4; в условиях стресса p53 претерпевает активирующие и стабилизирующие посттрансляционные модификации: фосфорилирование, ацетилирование, метилирование и сумоилирование [139]. Активация этого транскрипционного фактора происходит и в физиологических условиях, но модификации подвергается лишь небольшая часть молекул, что обеспечивает экспрессию генов метаболизма и генов антиоксидантных ферментов на базовом уровне [140]. P53 активируется в ответ на двуцепочечные разрывы в ДНК, регуляция осуществляется за счет киназ ATM и ATR, которые фосфорилируют киназы контрольных точек 2 (CHK2) и 1 (CHK1) соответственно. Эти киназы далее фосфорилируют p53 (Рисунок 10) [141].

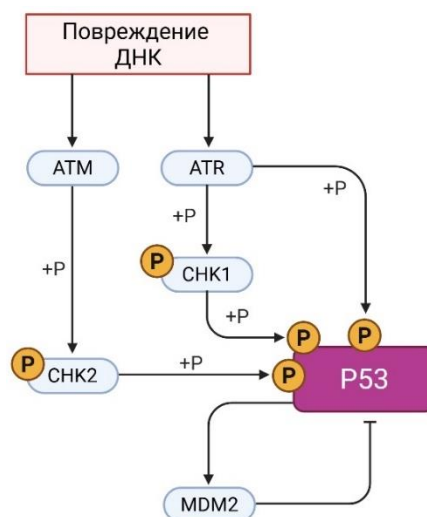


Рисунок 10 – Активация транскрипционного фактора p53 в ответ на повреждение ДНК посредством фосфорилирования. Рисунок подготовлен с использованием шаблона сайта biorender.com [142].

При гиперактивации в условиях стресса этот транскрипционный фактор регулирует экспрессию генов, обеспечивающих остановку клеточного цикла для репарации ДНК и, в случае если повреждения являются критическими и не поддаются репарации, запускающих гибель клетки по пути апоптоза [126].

Транскрипционный фактор NF-κB регулирует экспрессию генов, вовлеченных в процессы воспаления, управления иммунными реакциями, а также апоптоз, и представляет собой гомо- и гетеродимеры белков NF-κB1, NF-κB2, p65/RelA, c-Rel, RelB [143]. В неактивном состоянии NF-κB связан с ингибиторными белками (IκB). Связывание лигандов с рецепторами семейств TNF, TLR, а также воздействие генотоксических агентов приводят к активации комплекса киназ IKK, который фосфорилирует ингибиторы NF-κB, приводя к высвобождению транскрипционного фактора [144]. NF-κB регулирует экспрессию генов антиоксидантных ферментов, про- и анти-апоптотических белков, транскрипционных факторов [145].

1.7.2 Биологические процессы, активируемые в клетках в ответ на обработку холодной плазмой

Первые работы с описанием применения холодной плазмы для обработки опухолевых клеток были опубликованы в 2003-2005 годах. Авторы этих статей отмечали потерю клетками межклеточных контактов и открепление с поверхности субстрата, на

котором они культивировались [146], а также признаки апоптоза [147]. В 2010-м году опубликовано пилотное исследование по изучению противоопухолевых свойств плазмы *in vivo* на модели мышей с подкожно трансплантированными клетками глиобластомы человека, где впервые показано уменьшение объема опухоли после обработки плазмой [148]. В 2011-2012-х годах впервые было предложено использовать не только прямую, но и опосредованную обработку для воздействия на опухолевые клетки [149]. Была показана зависимость эффективности обработки от количества клеток и продолжительности обработки, а также показали снижение уровня киназы AKT1 в обработанных клетках. В том же году впервые была продемонстрирована возможность достижения селективного эффекта по отношению к опухолевым клеткам [150]. В дальнейших исследованиях методами вестерн-блоттинга и проточной цитометрии в клетках была исследована активация после обработки плазмой сигнальных путей JNK, p38, активация каспазы 3 и PARP [151], увеличение уровней p53 и проапоптотического белка BAX, снижение уровня анти-апоптотического белка Bcl-2 [152]. В 2010-х – начале 2020-х годов публикуется большое количество исследований, в которых предпринимаются попытки более детального изучения механизма ответа клеток на прямую или опосредованную обработку холодной плазмой, в том числе для выявления потенциальных мишеней для комбинированной терапии.

Удобным и информативным подходом для определения механизма действия того или иного терапевтического агента на клетки является анализ экспрессии генов по оценке уровней РНК-продуктов этих генов. Так, для оценки уровней мРНК отдельных генов с начала 1990-х и до настоящего времени широко применяется метод обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ). В середине 1990-х – начале 2010-х получил распространение метод анализа экспрессии генов с помощью микрочипов, позволяющий отслеживать изменение уровней сотен и тысяч видов мРНК одновременно. В конце 2000-х развились технологии высокопроизводительного секвенирования кДНК, что позволило перейти к анализу полных транскриптомов клеток, органов и организмов.

Развитие представлений о механизме противоопухолевого действия холодной плазмой шло параллельно с развитием технологий анализа экспрессии генов, поэтому в опубликованных работах присутствуют данные, полученные только при помощи ОТ-ПЦР РВ, только с использованием микрочипов, только в ходе анализа полных транскриптомов клеток, и более комплексные – с использованием комбинации этих подходов. Кроме того, опубликованы работы как по прямой обработке плазмой, так и по опосредованной, с использованием обработанных растворов и культуральной среды.

Первые работы с использованием микрочиповых технологий для изучения экспрессии генов показали, что при прямой обработке ХПС в гелии клеток плоскоклеточного рака легкого наблюдается изменение экспрессии генов, участвующих в адгезии и пролиферации клеток, регуляции роста и клеточной гибели [153].

В работе [154] изучали изменение экспрессии генов в клетках аденокарциномы легкого A-549 в динамике в течение первых 4 часов после обработки плазмой, генерируемой по принципу ДБР в гелии. Интересно, что для всех временных точек и всех доз плазмы наблюдалось преимущественное подавление экспрессии генов в этих клетках. Ключевыми процессами, вовлеченными в ответ клеток на обработку малой дозой плазмы, были активация сигнального пути p53, MAPK, TGF- β и TNF. При длительной обработке плазмой активировалась экспрессия генов, вовлеченных в ацетилирование гистонов. При предсказании транскрипционных факторов, влияющих на транскрипционные изменения, были отмечены факторы JUN, FOS, JAK, CEBPA, CEBPB, p53. Результаты были подтверждены методами ОТ-ПЦР РВ и вестерн-блотом.

В работе [155] исследовали изменение экспрессии генов в клетках миеломоноцитарной лимфомы U937 через 3 ч после обработки ХПС в аргоне и в аргоне с добавлением азота. Несмотря на различия в количестве дифференциально экспрессируемых генов по сравнению с необработанным контролем в этих двух группах, регуляция про-апоптотических (были выбраны гены *ANXA1*, *ATF3*, *FOS*, *JUN*, *KLF4*) и анти-апоптотических (*AHR*, *FTH1*, *NR4A2*, *DNAJB1*, *HMOX1*, *HSPA1A/B*, *HSPA6*, *BAG3*) генов качественно не отличалась. Дальнейший анализ методом ОТ-ПЦР РВ показал, что добавление азота приводило к усилению активации экспрессии антиапоптотических генов. Авторы высказывают предположение, что за счет генерации большего количества АФА при добавлении азота удастся достичь более активной генерации монооксида азота, который отвечает за активацию транскрипционного фактора HSF1 и индуцирует экспрессию белков теплового шока.

В работе Л. Ши с соавторами [156] для воздействия на клетки плоскоклеточной карциномы ротовой полости SCC15 использовалась среда, обработанная ХПС, генерируемой в воздухе. Клетки инкубировали в среде 1 час, после чего проводили лизис и анализировали транскриптом методом высокопроизводительного секвенирования. Была обнаружена активация генов, участвующих в сигнальных путях p53, Niprro, TNF, AGE-RAGE, FoxO.

К началу 2020-х годов стали накапливаться данные о возможности достижения селективности холодной плазмы по отношению к опухолевым клеткам и появились работы, в которых сравнивается ответ на обработку холодной плазмой пар клеток: опухолевых и

нетрансформированных. Так, при сравнении ответа клеток базалиомы человека TE354T и кератиноцитов HaCaT на обработку облученной ХПС средой было показано, что обработка имеет селективный характер, вызывая гибель преимущественно опухолевых клеток. Кроме того, накопление АФКА в клетках также происходило более интенсивно в опухолевых клетках. К сожалению, не было проведено анализа транскриптома нетрансформированных клеток на обработку средой, который мог бы выявить механизм различного ответа опухолевых и здоровых клеток. Анализ экспрессии генов опухолевых клеток через 4 и 8 часов после обработки выявил активацию сигнальных путей MAPK и TNF. Методом вестерн-блота было продемонстрировано расщепление каспазы 3 и 9, что свидетельствует об активации внутреннего пути апоптоза.

В другом сравнительном исследовании [157] использовали клетки меланомы A375, A875 и кератиноциты HaCaT, которые обрабатывали холодной плазмой, предварительно заменив культуральную среду на фосфатный буфер (PBS). После обработки плазмой (ДБР в воздухе) клетки снова помещали в среду. Стоит отметить, что, если замена PBS на среду, действительно, производилась сразу после обработки, то можно считать, что биологический эффект обусловлен АФКА, формирующимися при обработке и в первые секунды после нее. Однако авторы показали значительное накопление пероксида водорода и нитрит- и нитрат-ионов в PBS, обработанном в отсутствие клеток. Также было продемонстрирована преимущественная гибель опухолевых клеток при 3-минутной обработке. Анализ экспрессии генов проводили только для клеток меланомы A875, обработанных в течение 3 минут. Была показана активация сигнальных путей MAPK, p53, а также стимуляция некроптоза. Методом ОТ-ПЦР РВ была подтверждена активация экспрессии генов *CDKN1A*, *GADD45A*, *HSPA6*, *GADD45G*, *JUN*.

Эффект непрямого воздействия при помощи обработанной плазмой культуральной среды изучали также на клетках рака головы и шеи человека SNU1041, SNU1076, SCC25, а также на клетках персонализированной культуры фибробластов человека [158]. Анализ транскриптома не выявил достоверных изменений экспрессии генов в нетрансформированных фибробластах человека после культивирования с обработанной средой, при этом авторы никак не комментируют отсутствие какого-либо эффекта. В опухолевых клетках наблюдались признаки активации транскрипционного ответа на стресс эндоплазматического ретикулума. Потенциально активируемыми транскрипционными факторами, обуславливающими транскрипционные изменения, являлись ATF4 и DDIT3. Кроме того, наблюдали накопление АФКА внутри митохондрий, их повреждение, нарушение работы ЦПЭ и снижение потребления кислорода клетками. Авторы работы

делают вывод об индукции стресса митохондрий, вызванного накоплением несвернутых белков (mitochondrial unfolded protein response).

В работе [159], проведенной тем же коллективом авторов, изучался механизм гибели клеток рака щитовидной железы вследствие воздействия обработанной холодной плазмой средой. Большая часть экспериментов, в том числе эксперименты по выяснению механизма гибели клеток, проведена только на опухолевых клетках. Отмечается ключевая роль генов *EGR1*, *ATF4*, *DDIT3* в ответе клеток на обработку. Так же, как и в предыдущей работе, делается вывод об индукции ответа на несвернутые белки в митохондриях.

Интересными являются работы по изучению механизма ответа на обработку холодной плазмой клеток, устойчивых к действию химиопрепаратов. Так, показано, что ХПС способствует восстановлению чувствительности устойчивых к тамоксифену клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 [160]. Эффект обусловлен изменением экспрессии генов *MX1* и *HOXC6*. При этом авторами было показано, что опухолевые клетки, устойчивые к действию тамоксифена, демонстрируют повышенный уровень внутриклеточных АФКА по сравнению с чувствительными к этому препарату клеткам. В другой работе тот же коллектив авторов показал восстановление чувствительности резистентных к паклитакселю клеток MCF-7 [161] за счет изменения экспрессии генов *DAGLA* и *CEACAM1*.

В работе [162] для воздействия на клетки и для введения животным использовали физиологический раствор, обработанный ХПС, а также физиологический раствор с добавлением пероксида водорода и нитрат-ионов до концентрации, аналогичной в обработанном растворе. Обработка клеток этими растворами с последующим анализом экспрессии генов показала активацию экспрессии гена *XBP-1* вследствие активации транскрипционного фактора *ATF6*, вовлеченного в регуляцию стресса ЭПР в ответ на несвернутые белки.

Интерес представляют работы, изучающие не только экспрессию генов на уровне мРНК, но также и экспрессию микроРНК, участвующих в регуляции экспрессии генов. В недавней работе [163] с помощью секвенирования микроРНК была проведена оценка экспрессии их генов в клетках хронической миелоидной лейкемии K562. Исследователи показали, что через 24 ч после обработки ХПС в клетках наблюдается повышенная по сравнению с контролем экспрессия 17 микроРНК и пониженная экспрессия 11 микроРНК. Авторы провели функциональный анализ генов, являющихся потенциальными мишенями выявленных микроРНК, и показали, что эти гены участвуют в сигнальных путях *sAMP*, *mTOR*, *AMPK* и сигнальной системе фосфатидилинозитола.

Временные рамки сигнальных процессов в клетках после обработки холодной плазмой указаны в таблицах 1 и 2, суммирующих приведенное выше описание эффектов.

Таблица 1 – Биологические эффекты холодной плазмы на эукариотические клетки в культуре при прямой обработке и их временные рамки

Культура клеток	Устройство, использованное для обработки	Наблюдаемые эффекты
Клетки карциномы лёгкого человека MR65, клетки яичников китайского хомячка CHO-K1	ХПС в гелии	Обработка высокой дозой ХПС приводила к некрозу клеток в течение 1 ч. При обработке в «мягких» условиях наблюдается нарушение межклеточных контактов и открепление клеток от подложки, восстановление адгезии в течение 4 ч после обработки [146].
Меланома мыши B16, карцинома молочной железы человека BrSk	ХПС в гелии, генерация при разных температурах	Наблюдалось снижение жизнеспособности клеток после обработки, индукция апоптоза. Величина цитотоксического эффекта была прямо пропорциональна продолжительности и температуре обработки [147].
Клетки эпителия молочной железы человека MCF10A	ДБР в воздухе	В течение 1 ч после обработки – повышение содержания внутриклеточных АФКА. Через 1 ч после обработки – фосфорилирование гистона H2AX, отсутствие образования тиминовых димеров. Фосфорилирование H2AX после обработки плазмой зависит от киназы ATR, но не от ATM. Анализ жизнеспособности клеток через 24 ч показал, что низкие дозы стимулировали пролиферацию клеток, средние – не оказывали значительного влияния, высокие дозы уменьшали количество клеток, ингибировали выживаемость и индуцировали апоптоз [164].

Продолжение таблицы 1

Культура клеток	Устройство, использованное для обработки	Наблюдаемые эффекты
Клетки меланомы человека: преме­та­ста­ти­че­ская WM793В и ме­та­ста­ти­че­ская 1205Lц. Первичные кератиноциты человека	ХПС в гелии	Через 15 минут после обработки наблюдалось образование пузырьков на мембранах опухолевых клеток, но не кератиноцитов. TUNEL-анализ, проведенный через 18 часов продемонстрировал инициацию апоптоза у 90% клеток меланомы против 20% у кератиноцитов. Анализ жизнеспособности клеток через 24 ч показал преимущественную гибель опухолевых клеток, причем для клеток метастатической меланомы показана более интенсивная гибель, чем для клеток преме­та­ста­ти­че­ской меланомы [150].
Клетки рака головы и шеи: FaDu, HN9, SNU899, SNU1041	ХПС в гелии с примесями кислорода	Через 24 ч после обработки наблюдались индукция апоптоза, увеличение уровня активных форм кислорода (АФК), включая митохондриальный супероксид, потеря мембранного потенциала митохондрий, активация каспазы-3, JNK, p38 и расщепление PARP [151].
Клетки метастатического рака молочной железы мыши 4T1	ХПС в гелии	Через 24 ч после обработки ХПС показано ингибирование миграционной способности клеток, а также индукция апоптоза. Через 36 часов показано увеличение доли клеток, претерпевших остановку клеточного цикла в фазах subG1 и G2/M [152].

Продолжение таблицы 1

Культура клеток	Устройство, использованное для обработки	Наблюдаемые эффекты
Клетки плоскоклеточной карциномы легкого человека SW900, эпителиальные клетки бронхов человека NHBE. Клетки плоскоклеточного рака мочевого пузыря человека. Клетки меланомы мыши B16-F10 и макрофаги мыши.	ХПС в гелии	Через 24 и 48 часов наблюдалась дозозависимая индукция апоптоза. При анализе образцов опухоли, обработанных <i>in vivo</i>, показано изменение экспрессии генов, участвующих в адгезии и пролиферации, гибели клеток, а также в ответе на окислительный стресс [153].
Клетки аденокарциномы легкого человека A-549	ДБР в гелии	Обработка в течение 1 мин не приводила к значимому изменению жизнеспособности клеток в первые 8 часов после обработки, обработка в течение 3 мин приводила к гибели 80% клеток через 4 ч и всех клеток через 8 часов. Через 4 ч после обработки в течение 1 минуты происходила активация сигнальных путей MAPK, p53, TGF-β, TNF, IL-4, транскрипционных факторов JUN, FOS, CEBPA, CEBPB, генов ответа на повреждение ДНК (GADD45) и подавление процессов, связанных с фазами митоза, ответом на повреждение ДНК, регуляцией экспрессии генов посредством miRNA.

Продолжение таблицы 1

Культура клеток	Устройство, использованное для обработки	Наблюдаемые эффекты
Клетки аденокарциномы легкого человека А-549 (продолжение)	ДБР в гелии	Методом ОТ-ПЦР РВ показана активация экспрессии генов <i>EGR1</i>, <i>FOS</i>, <i>JUN</i>, <i>JUNB</i>, <i>TNFAIP3</i>, <i>CXCL2</i>, <i>CXCL3</i>. Вестерн-блот анализом продемонстрирована накопление к 8 и 16 часам после обработки mTOR и его фосфорилированной формы, активация каспазы 3, расщепление PARP1, фосфорилирование JNK и p38 киназ, увеличение уровней белков c-Jun, JunB в течение 2-24 часов. Обработка в течение 3 мин через 2 ч приводила к повышению экспрессии генов-регуляторов транскрипции, понижению экспрессии генов, связанных с метаболизмом и активностью метилтрансфераз. Через 4 ч наблюдалась активация экспрессии генов, связанных со сборкой нуклеосом, репликацией ДНК, ацетилированием гистонов, регуляцией транскрипции. Подавлялась экспрессия генов, вовлеченных в метаболизм нуклеиновых кислот, АТФ, связанных с клеточным циклом и организацией клеточных компонентов [154].
Клетки миеломоноцитарной лимфомы U937	ХПС в аргоне с примесями азота	Добавление 2,5% азота в состав рабочего газа повышало жизнеспособность клеток и снижало количество клеток, положительных при окраске аннексином V по сравнению с ХПС в аргоне. Через 3 ч после обработки была показана повышенная экспрессия генов как про-, так и антиапоптотических белков, причем повышенная экспрессия последних была более выражена для обработки ХПС в смеси газов.

Продолжение таблицы 1

Культура клеток	Устройство, использованное для обработки	Наблюдаемые эффекты
Клетки миеломоноцитарной лимфомы U937 (продолжение)	ХПС в аргоне с примесями азота	Обработка ХПС в Ar+N ₂ повышала экспрессию генов белков теплового шока, а также BAG3 и HMOX1. Авторы предполагают, что индукция экспрессии этих генов может быть связана с активацией транскрипционного фактора HSF1 под действием АФКА, возможно, NO [155].
Клетки меланомы человека A375, A875, кератиноциты человека HaCaT	ДБР в воздухе	Анализ жизнеспособности через 24 ч выявил преимущественную гибель опухолевых клеток, индукцию апоптоза в этих клетках, повышение уровней внутриклеточных АФКА. Анализ экспрессии генов продемонстрировал повышенную экспрессию генов HSPA6, JUN, FOS, GADD45G, GDF15, ATF3, а также активацию сигнальных путей MAPK, p53, TNF, а также некроптоз [157].
Клетки хронической миелоидной лейкемии человека K562	ХПС в аргоне	Через 24 ч после обработки показано изменение экспрессии 28 микроРНК, участвующих в регуляции метаболизма и сигнальных путей cAMP, AMPK, mTOR [163].

Из данных таблицы 1 видно, что ранний ответ (до 4 часов после обработки) клеток на обработку плазмой характеризуется повышением АФКА внутри клеток, активацией сигнальных путей MAPK, p53, TGF- β , TNF, IL-4 и наличием признаков гибели клеток по пути апоптоза. Через 24 ч после обработки также наблюдались признаки апоптоза, ингибирование миграционной способности клеток, остановка клеточного цикла клеток.

Таблица 2 – Биологические эффекты холодной плазмы на эукариотические клетки в культуре при не прямой обработке и их временные рамки

Культура клеток	Тип жидкости и устройство, использованное для обработки	Наблюдаемые эффекты
Клетки глиобластомы человека U251SP, первичные здоровые астроциты человека ACBRI-371	Среда DMEM или CSC, обработанная ДБР в аргоне	Через 4 ч после обработки показана индукция в них апоптоза, активация каспаз 3 и 7 и подавление экспрессии и фосфорилирования киназы АКТ. При оценке жизнеспособности клеток через 24 ч показана селективная гибель опухолевых клеток. Обработанная среда сохраняла цитотоксичность при хранении до 8 часов [149]
Клетки плоскоклеточной карциномы полости рта человека SCC15	Среда DMEM с 10% FBS, обработанная ХПС в воздухе	В течение первых 2 часов после замены среды наблюдалось снижение жизнеспособности клеток до 50%. Через 1 час после начала инкубации наибольшему изменению экспрессии подвергается ген глутатион-специфичной гамма глутамилциклотрансферазы 1 <i>CHAC1</i> – проапоптотического компонента ответа на стресс эндоплазматического ретикулума. Показано, что дифференциально экспрессируемые гены участвуют в сигнальных путях p53, Niprro, TNF, AGE-RAGE, FoxO [156].

Продолжение таблицы 2

Культура клеток	Тип жидкости и устройство, использованное для обработки	Наблюдаемые эффекты
Клетки рака головы и шеи SNU1041, SNU1076, SCC25; первичные фибробласты человека	Среда DMEM или DMEM/F-12, обработанная ХПС в гелии с примесью кислорода	Через 24 ч после замены среды показано увеличение доли клеток, положительных при окраске аннексином V, активация каспазы 3 и расщепление PARP1, а также снижение скорости потребления кислорода клетками, повреждение митохондрий, снижение уровней белков-участников ЦПЭ, повышение уровня митохондриального супероксида. В нормальных фибробластах не было выявлено изменений в экспрессии генов, тогда как в опухолевых клетках активировалась экспрессия генов, регулирующих гибелью клеток, клеточным циклом, а также генов, связанных со стрессом ЭПР [158].
Клеточные линии рака щитовидной железы: BCPAP, HTh7, KTC2, 8505C, FRO-Luc и нормальные клетки щитовидной железы Nthy-ori3-1	Среда RPMI-1640, обработанная ХПС в гелии с примесью кислорода	Через 1 час после обработки наблюдалось накопление поврежденных митохондрий в опухолевых клетках, нарушение работы ЦПЭ. Через 6 часов после обработки – изменение морфологии клеток и открепление от подложки. Через 24 ч активация каспазы 3, расщепление PARP, снижение экспрессии Bcl-2.

Продолжение таблицы 2

Культура клеток	Тип жидкости и устройство, использованное для обработки	Наблюдаемые эффекты
Клеточные линии рака щитовидной железы: ВСПАР, НТh7, КТС2, 8505С, FRO-Luc и нормальные клетки щитовидной железы Nthy-ori3-1 (продолжение)	Среда RPMI-1640, обработанная ХПС в гелии с примесью кислорода	Анализ экспрессии генов в образцах клеток ВСПАР и 8505С через 24 ч инкубации со средой показал, что гены с повышенной экспрессией участвуют в митофагии, биогенезе рибосом, гены с пониженной экспрессией – в метаболизме пирувата, окислительном фосфорилировании, гликолизе, пентозофосфатном пути, деградации жирных кислот. Происходила активация транскрипционных факторов EGR1, DDIT3, ATF4 [159].
Клетки карциномы прямой кишки HT-29, рака поджелудочной железы Панс-01, рака яичников SKOV3. Кератиноциты HaCaT	Физиологический раствор, обработанный ХПС в аргоне	Через 4 ч после обработки наблюдалось накопление АФКА в клетках и повышенная экспрессия генов ответа на несвернутые белки. Через 6 ч – экспозиция на внешнюю поверхность мембраны кальретикулина, белка теплового шок 70. Через 24 ч – повышение уровня окисленного глутатиона, гибель клеток, активация каспаз 3/7 [162]

В случае не прямой обработки клеток (Таблица 2) ранний ответ на обработку характеризуется, так же, как и в случае с прямой обработкой, индукцией апоптоза, накоплением в клетках АФКА, кроме того, накоплением поврежденных митохондрий и нарушением работы ЦПЭ, также наблюдаются признаки стресса ЭПР. Через 24 ч после обработки сохраняются признаки апоптоза, а также повреждения митохондрий.

Таким образом, обработка клеток холодной плазмой как при прямом, так и при не прямом воздействии стимулирует развитие окислительного стресса в клетках, который приводит к повреждению биомолекул и органелл и запуску апоптоза в клетках. Причем индукция апоптоза показана как в течение нескольких часов после обработки ХПС, так и

на более поздних этапах ответа, что может говорить о сохранении стрессового воздействия на клетки.

1.8 Отличия опухолевых и нетрансформированных клеток, потенциально влияющих на чувствительность к АФКА

Предполагается, что селективный эффект холодной плазмы на опухолевые клетки, показанный в ряде публикаций, обусловлен разной реакцией опухолевых и нетрансформированных клеток на окислительный стресс. Рассмотрим основные различия между онкотрансформированными и нетрансформированными клетками.

Д. Ханахан и Р. Вайнберг выделили 6 отличительных черт, присущих онкотрансформированным клеткам [165]: 1) способность обеспечивать себя молекулярными сигналами, стимулирующими рост клеток; 2) нечувствительность к молекулярным сигналам, ингибирующим рост клеток; 3) способность избегать инициации гибели клеток по пути апоптоза; 4) способность к бесконечному делению; 5) стимуляция ангиогенеза; 6) способность к инвазии в прилежащие ткани и метастазированию. Позднее к этому списку были добавлены избегание иммунного ответа, воспаление, стимулированное опухолью, нестабильность генома и репрограммирование метаболизма клетки [166]. В обзоре 2022-го года к отличительным чертам онкотрансформированных клеток отнесены также фенотипическая пластичность, репрограммирование эпигенетических процессов, изменения микробиома тканей и наличие стареющих клеток [167]. Перечисленные характеристики присущи большинству типов онкотрансформированных клеток, поэтому потенциальная стратегия селективной терапии должна воздействовать на одну или несколько таких характеристик.

Для понимания потенциально различной реакции опухолевых клеток на окислительный стресс необходимо более подробно рассмотреть отличия метаболизма онкотрансформированных и здоровых клеток.

Метаболизм клеток при онкотрансформации претерпевает значительные изменения для обеспечения потребностей клеток в активном росте. Наиболее изученным феноменом, который характерен для большого количества опухолевых клеток, является эффект Варбурга – использование гликолиза с последующим превращением пирувата в лактат в качестве основного пути катаболизма глюкозы даже в присутствии достаточных концентраций кислорода [168]. В опухолевых клетках наблюдается стимуляция импорта глюкозы в клетку, а также повышенная экспрессия ферментов гликолиза. Активное использование гликолиза и пентозофосфатного пути позволяет активно пролиферирующим

клеткам эффективно генерировать восстановительные эквиваленты (в форме NADPH) и предшественники биомолекул, необходимые в биосинтезе жирных кислот, нуклеотидов и аминокислот [169]. Преобразование пирувата, образованного в гликолизе, в лактат предотвращает накопление NADH в цитоплазме и снижает количество АТФ, что позволяет избежать ингибирования гликолиза по механизмам обратной связи. Образованный лактат экспортируется из клетки и в межклеточном пространстве способствует понижению pH, что может стимулировать инвазию и метастазирование клеток, а также помогать клеткам избегать иммунного ответа [170]. Стоит отметить, что цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) и окислительное фосфорилирование также остаются функциональными в опухолевых клетках и используются как для генерации АТФ, так и для биосинтетических целей.

Онкотрансформированные клетки характеризуются интенсивным потреблением глутамина, который, претерпевая превращение сначала в глутаминовую кислоту, а затем в 2-кетоглутарат, восполняет промежуточные продукты ЦТК. В англоязычной литературе для описания этого изменения активно используется термин «глутаминолиз». Кроме того, глутамин служит источником азота и аспартата для синтеза азотистых оснований [171]. Важным направлением использования глутамата является синтез глутатиона, который используется для работы антиоксидантных систем клетки: глутамат необходим для транспорта в клетки цистеина антипортером SLC7A11, а также для синтеза γ -глутамилцистеина – предшественника глутатиона.

Другим метаболическим процессом, претерпевающим изменения при онкотрансформации, является метаболизм липидов, включающий в себя активацию *de novo* синтеза, стимуляцию захвата жирных кислот и изменения в окислении жирных кислот [168]. В опухолевых клетках часто наблюдается увеличение экспрессии ферментов, участвующих в синтезе липидов, такие как АТФ-цитрат лиаза (ACLY), ацетил-СоА карбоксилаза (ACC), синтаза жирных кислот (FASN), а ингибирование этого процесса рассматривается как потенциальный подход к терапии [172]. Кроме того, в опухолевых клетках наблюдается активный синтез и захват холестерина [173]. Холестерин снижает «текучесть» мембран, способствует образованию липидных рафтов и таким образом предотвращает распространение перекисного окисления липидов и ферроптоз [174].

На первых этапах изучения метаболизма опухолевых клеток считалось, что эти изменения являются причиной трансформации клеток, однако к настоящему моменту ясно, что наблюдаемые модификации – следствие активации онкогенных сигнальных каскадов [175].

Так активация транскрипционного фактора MYC в онкогенезе приводит к повышению экспрессии гена белка-транспортера глюкозы SLC2A1, генов ферментов гликолиза: HK2, ENO1, GAPDH, TPI, LDHA, белков-транспортеров монокарбоновых кислот, в том числе лактата: MCT1, MCT2 [176]. Кроме того, MYC регулирует экспрессию генов белков, участвующих в метаболизме глутамина, незаменимых аминокислот, жирных кислот, нуклеиновых кислот [177].

Онкогены RAS (KRAS, NRAS, HRAS) кодируют группу ГТФаз, которые активируются в ответ на воздействие ростовых факторов и других внеклеточных стимулов и способны стимулировать передачу сигналов посредством MAP-киназ и пути PI3K/AKT. Показано, что активация этих сигнальных путей приводит к повышению экспрессии генов ферментов гликолиза, стимуляции неокислительного пентозофосфатного пути и синтеза жирных кислот, а также к активации глутаминализа и захвата питательных веществ из внеклеточного пространства путем макропиноцитоза [178].

Ключевым для солидных опухолей транскрипционным фактором, регулирующим метаболизм, является фактор HIF1A, активируемый в условиях гипоксии. Клетки опухоли имеют разный доступ к кислороду, который зависит от их удаленности от кровеносных сосудов. HIF1A стабилизируется в условиях гипоксии и стимулирует переключение метаболизма на анаэробный гликолиз а также активирует экспрессию гена ростового фактора VEGF, способного стимулировать ангиогенез [179].

Репрограммирование метаболизма в опухолевых клетках для обеспечения активной пролиферации значительно влияет на протекание окислительно-восстановительных процессов в клетке. Активация перечисленных выше онкогенов может приводить к увеличению концентрации АФКА в клетках, что приводит к стимуляции пролиферации клеток. Например, активация RAS приводит к увеличению экспрессии NADPH-оксидазы 4 и накоплению АФК [180]. Работа онкогена MYC приводит к активации экспрессии генов белков, входящих в состав ЦПЭ, что приводит к гиперэкспрессии отдельных компонентов комплексов ЦПЭ и может приводить к неправильной сборке комплексов, что влечет за собой более активную генерацию АФК [181,182]. Кроме того, протекание как катаболических, так и анаболических окислительно-восстановительных реакций, как было отмечено в пп.1.2.1, может сопровождаться «утечкой» электронов, по этой причине увеличение общей скорости метаболизма приводит к накоплению АФКА в клетке [183]. Повышение концентраций АФКА в клетках требует большего количества и активности антиоксидантных ферментов для поддержания уровня, необходимого для стимуляции пролиферации, но недостаточного для инициации клеточной гибели. Так, в опухолевых клетках встречаются мутации компонентов сигнального пути, зависящего от активности

транскрипционного фактора NRF2 (NFE2L2): отмечены соматические мутации в генах *NFE2L2*, *KEAP1*, *CUL3*, а также изменения в эпигенетических механизмах регуляции экспрессии этих генов, например, повышенная экспрессия гена деацетилазы гистонов SIRT6, способствующей ингибированию транскрипции [184]. В результате наблюдается увеличение уровня NFE2L2, который активирует экспрессию генов антиоксидантных ферментов. В клетках ряда опухолей активация пути NRF2 зависит от повышенной экспрессии гена тимидилат-синтазы *TYMS* [185].

Таким образом, измененный по сравнению со здоровыми клетками метаболизм опухолевых клеток направлен на обеспечение анаболических реакций, необходимых для пролиферации клеток, инвазии и метастазирования. Эти изменения сопровождаются усиленной генерацией внутриклеточных АФКА и повышенной экспрессией генов антиоксидантных белков. При этом избыток АФКА, образуемый при действии на опухолевые клетки индукторами окислительного стресса, позволяет превышать способность ферментных систем нейтрализовывать эти молекулы и радикалы и вызывать гибель клеток [182]. Указанные особенности могут помочь в разработке селективных подходов к противоопухолевой терапии.

1.9 Факторы, влияющие на чувствительность клеток к обработке ХПС

К началу 2020-х годов накопились данные, которые позволили сформулировать гипотезы о возможных причинах селективности воздействия холодной плазмы на опухолевые клетки, а также о различной чувствительности различных опухолевых клеток к обработке. Так, в обзоре 2020-го года Сэмплер с соавторами предлагают следующие гипотезы [186]:

1) Корреляция чувствительности к обработке холодной плазмой с уровнем базовой экспрессии аквапоринов. Аквапорины – белки, участвующие в трансмембранном переносе воды, а также других молекул: диоксида углерода, аммиака, монооксида азота, пероксида водорода и других. Показано [187], что во многих опухолевых клетках наблюдается повышенная экспрессия аквапоринов по сравнению с нормальными клетками того же гистологического происхождения, что может способствовать более активному транспорту образованных во внеклеточном пространстве АФКА после обработки плазмой.

2) Зависимость чувствительности клеток к обработке холодной плазмой от содержания холестерина в мембране клеток. В экспериментах с использованием липосом различного состава, а также в ходе моделирования методом молекулярной динамики показано, что низкая доля холестерина способствует большей нестабильности мембран при

окислении двойных связей ненасыщенных жирных кислот, проникновению АФКА через эти мембраны и формированию пор в мембранах при обширном окислительном повреждении липидов [188,189].

3) Зависимость чувствительности клеток от активности антиоксидантных систем, содержания глутатиона и NAD(P)H в клетке.

В работе той же группы 2021 года проводилась оценка этих гипотез [190]. На примере 36 опухолевых и 2 неопухолевых линий клеток была проанализирована корреляция IC₂₅ с уровнем представленности 33 молекул на поверхности клеток. В число этих молекул входили аквапорины 0-11 (AQP0-AQP11), каталаза, NO-синтазы, NADPH-оксидазы и другие. Наиболее сильная корреляция была выявлена для аквапорина 1 и NADPH-оксидазы 3, коэффициент корреляции Спирмена при этом составил $0,5 < r < 0,6$. Средняя корреляция ($0,4 < r < 0,5$) была показана для каталазы, NO-синтазы 1 и 3, NADPH-оксидазы 4, белка теплового шока 70. Кроме того, изучалась корреляция устойчивости клеток к действию ХПС с содержанием холестерина в плазматической мембране и метаболической активностью клеток. На примере 10 линий клеток была показана высокая ($r=0,68$) корреляция устойчивости клеток с содержанием холестерина. Фактором с наибольшим значением коэффициента корреляции ($r=0,76$) наблюдалась для метаболической активности клеток. Последняя изучалась при помощи восстановления резазурина NAD(P)H в присутствии цитоплазматических и митохондриальных редуктаз/Интересно, что фибробласты кожи и кератиноциты HaCaT, использованные в качестве неопухолевых клеток, характеризовались промежуточными значениями представленности поверхностных маркеров, содержания холестерина и метаболической активности.

Таким образом, изучение механизмов устойчивости и чувствительности клеток к обработке холодной плазмой требует дальнейшего изучения и разработки новых моделей.

1.10 Подходы к противоопухолевому применению холодной плазмы *in vivo*

Использование холодной плазмы для обработки опухолей *in vivo* в настоящее время затруднено широким разнообразием устройств, генерирующих ХПС, различиями их параметров и профиля производимых АФКА. Для применения устройств для терапии опухолей в живом организме требуется тщательный подбор и стандартизация параметров обработки.

При переходе от экспериментов на клетках к животным с применением холодной плазмы существует проблема глубины проникновения генерируемых АФКА в организме. Так, на *ex vivo* системах и при помощи моделирования показано, что нитрит- и нитрат-

ионы, а также пероксид водорода могут проникать через кожу, при этом гидроксил-радикал, озон и синглетный кислород задерживаются роговым слоем кожи [191,192]. Описано два основных подхода к применению холодной плазмы для терапии опухолей *in vivo*: прямая обработка опухолей и обработка биосовместимых растворов с последующей их инъекцией животным. В качестве обрабатываемых жидкостей используют культуральную среду, физиологический раствор, раствор Рингера (Таблица 3).

Несмотря на то, что на первый взгляд непрямая обработка кажется более подходящей для применения *in vivo*, не совсем ясно, какие концентрации АФКА должны достигаться во вводимых растворах, чтобы достигать опухолей в организме. Кроме того, высокие концентрации АФКА в месте введения могут стимулировать окислительный стресс в здоровых тканях. Тем не менее, с применением ХПС-облученных растворов были продемонстрированы противоопухолевые эффекты на нескольких животных моделях.

В работе [193] моделировали подавление метастазов с помощью плазма-облученной культуральной среды RPMI-1640. Клетки эпителиального рака желудка GCIY вводили внутрибрюшинно мышам Nude, после чего также внутрибрюшинно вводили облученный раствор по следующей схеме: 4 дня начиная со дня введения опухолевых клеток ежедневные введения РАМ, 4 дня перерыв, 4 дня ежедневные введения. Показано, что такая схема введения предотвращает образование метастазов (обнаружены у 2/5 животных по сравнению с 5/5 в контрольной группе).

Возможным преодолением нежелательного распределения АФКА по всему организму может быть локальное введение в опухоль облученных растворов, как это показано для подкожно трансплантированной мышам Nude синовиальной саркомы человека HS-SY-II [194]. Облученную среду DMEM вводили несколькими инъекциями в суммарном объеме 200 мкл вокруг опухоли ежедневно в течение 4 недель, а контрольные животные получали аналогичным образом DMEM без облучения, и такое лечение тормозило рост опухоли на 59 %. В работе [195] подкожно растущие клетки линии Ba/F3 с мутацией BCR-ABL¹⁷³¹⁵¹ инъецировали раз в три дня ХПС-облученным физиологическим раствором (200 мкл), причем инъекции производили в прилегающие к опухоли ткани. После шести инъекций, размер опухолей в группе, получавших облученный NaCl был в 2 раза меньше, чем в контрольной группе. Такой эффект может говорить о прямом влиянии на активно пролиферирующие клетки опухоли, расположенные по ее периферии, так и на микроокружение опухоли, в том числе на компоненты внеклеточного матрикса.

Некоторые исследователи создают устройства оригинальной конструкции для доставки генерируемых АФКА к опухолевым клеткам. Например, Чжоу с соавторами разработали генератор холодной плазмы с возможностью доставки потока

внутриопухолево при помощи иглы [196]. В другой работе [197] для внутрикожной доставки АФКА использовались патчи с микроиглами, изготовленные из замороженного физиологического раствора, обработанного плазмой.

Обзор статей, в которых описывается оценка противоопухолевой эффективности холодной плазмы при прямом и непрямом воздействии, приведен в таблице 3.

Таблица 3 - Обзор исследований противоопухолевой эффективности холодной плазмы *in vivo*

Используемая модель	Подход к обработке	Наблюдаемые эффекты
Мыши линии Swiss nude с трансплантированными подкожно клетками глиобластомы человека U-87 MG	Прямая обработка	Плазма тормозила рост опухолей. Иммуногистохимический анализ выявил активацию каспазы 3 в клетках опухоли [198]
Мыши линии AJ с трансплантированными подкожно клетками нейробластомы человека Neuro2a	Прямая обработка	Плазма значительно затормозила рост опухоли и увеличила выживаемость животных [199]
Мыши линии АТНУМ-Foxn1 nu/nu с трансплантированными подкожно клетками холангиокарциномы человека EGI-1	Прямая обработка	Плазма тормозила рост опухоли, эффект был слабее, чем при терапии гемцитабином. При терапии плазмой не наблюдалось значимого изменения ферментов печени в крови животных. Показана активация каспазы 3, а также наличие 8-оксогуанина в ДНК клеток опухоли [200].

Продолжение таблицы 3

Используемая модель	Подход к обработке	Наблюдаемые эффекты
Мыши линии C57BL/6 с трансплантированными подкожно клетками меланомы мыши B16F10 или клетками аденокарциномы прямой кишки мыши MC38	Прямая обработка	Обработка плазмой снижала пролиферацию клеток обоих типов опухолей, активировала каспазу 3. При этом гистологический анализа не выявил изменений в коже животных в месте обработки [201].
Мыши линии BALB/c nu/nu с трансплантированными подкожно клетками синовиальной саркомы человека HS-SY-II	Непрямая: обработанная среда DMEM	Обработанная плазмой среда подавляла рост опухолей, без побочных эффектов [202].
Кошка с плоскоклеточным раком кожи в периокулярной области, на носовой перегородке и на нижней губе	Прямая обработка	Показан ответ опухолей на терапию, гибель клеток опухоли, повышенную экспрессию каспазы 3 и ФНО-альфа. Обработка приводила к незначительному повышению температуры, однако вела к формированию эритемы и образованию корки [203].
Мыши линии BALB/c nude с трансплантированными подкожно клетками лейкемии мышей Ba/F3, несущими мутацию BCR-ABL1 ^{T315I}	Прямая и непрямая (физиологический раствор) обработка	Как прямая, так и непрямая обработка эффективно снижали скорость роста опухоли и увеличивали выживаемость животных [195].

Продолжение таблицы 3

Используемая модель	Подход к обработке	Наблюдаемые эффекты
BALB/c Slc-nu/nu с трансплантированными внутрибрюшинно клетками рака желудка человека GCIY – модель метастазирования в брюшную полость	Непрямая обработка (среда RPMI-1640)	Внутрибрюшинные инъекции обработанной среды приводили к формированию опухолевых узлов у 2 из 5 животных по сравнению со 5 из 5 в контрольной группе [193]
Мыши линии BALB/c nude с трансплантированными подкожно клетками плоскоклеточной карциномы шейки матки человека SiHa	Непрямая обработка (раствор Рингера с лактатом)	Подкожные инъекции раствора Рингера с лактатом, обработанного холодной плазмой приводили к значительному снижению размеров опухолей [204]
Тамоксифен-индуцируемая модель рака ротовой полости с двойным нокаутом по гену Mob1a/b, мыши линии DKO	Непрямая обработка (раствор Рингера с лактатом)	В группе животных, которым проводили внутрибрюшинные инъекции обработанного плазмой раствора, снижалась частота образования опухолей, увеличивалась выживаемость животных. Гистологический анализ выявил снижение экспрессии глутатионпероксидазы 4, повышенное содержание 8-оксогуанина и 4-гидроксинафтола в тканях. Гибель опухолевых клеток происходила по пути ферроптоза [205].

Кроме исследований противоопухолевой эффективности на животных, опубликованы результаты применения ХПС для обработки плоскоклеточного рака кожи ротоглотки у 6 пациентов [206]. Опухоли имели контаминированные изъязвления. Обработка ХПС приводила к снижению бактериальной нагрузки ран и уменьшению

воспаления. У двух пациентов наблюдалось уменьшение размеров опухолей, у двух других продолжительные периоды остановки роста. Гистологический анализ выявил снижение количества миелоидных клеток, активно пролиферирующих клеток, а также присутствие клеток в состоянии апоптоза.

В 2023-м году были опубликованы результаты первого клинического исследования первой фазы, проведенного в США [207]. ХПС использовали для обработки операционного поля после удаления солидных опухолей и оценивали безопасность применения устройства для пациентов, а также рецидивы заболевания. У пациентов не наблюдалось побочных эффектов, связанных с обработкой ХПС. При исследовании образцов тканей *ex vivo* была показана селективная гибель опухолевых клеток по пути апоптоза, сниженная экспрессия маркера опухолевых стволовых клеток, повышенная экспрессия белка BID, а также повреждение ДНК опухолевых клеток.

Таким образом, как прямая, так и непрямая обработка опухолей холодной плазмой *in vivo* показывают противоопухолевую безопасность и эффективность в пилотных исследованиях. Завершена первая стадия клинических исследований устройства, генерирующего ХПС. Несмотря на эти успехи, существует ряд проблем, связанных с применением холодной плазмы *in vivo*. Остается неизученным механизм проникновения физико-химических факторов через кожу животных и их селективного действия на опухолевые клетки. Существует необходимость в разработке составов растворов для не прямой обработки, а также способов доставки образующихся биологически активных соединений к опухолевым клеткам.

Заключение

Холодная плазма широко используется в биомедицинских исследованиях последних десятилетий. За счет возможности варьирования большого количества параметров генерации: конструкции генератора, электродной конфигурации, типа и амплитуда иницирующего плазму напряжения, частоты, состава рабочего газа и скорости его подачи, можно варьировать состав активных форм кислорода и азота, генерируемых в потоке холодной плазмы и тем самым изменять биологические эффекты плазмы.

Начиная с конца 2000-х годов активно изучается возможность применения холодной плазмы для воздействия на опухолевые клетки *in vitro* и *in vivo*. Так, показан цитотоксический и цитостатический эффект холодной плазмы в отношении опухолевых клеток человека и мыши, опубликованы работы, описывающие механизм ответа опухолевых клеток на обработку и механизм индукции апоптоза. При этом остается

актуальным выяснение событий, происходящих на ранних стадиях ответа клеток на обработку плазмой, а также возможность инициации типов гибели клеток, отличных от апоптоза. Кроме того, несмотря на частое использование в работах клеток неопухолевого происхождения, возможность достижения селективного воздействия на опухолевые клетки с минимальным эффектом на прилежащие здоровые ткани остается важным вопросом, требующим дополнительных исследований.

Детальное исследование механизмов ответа клеток на обработку холодной плазмой позволит использовать этот подход в комбинации с таргетными подходами к терапии онкопатологий, например, для блокировки путей, способствующих выживанию опухолевых клеток.

Для использования холодной плазмы *in vivo*, как было отмечено ранее, необходим подбор параметров, минимизирующих как локальные, так и системные побочные эффекты, для чего может потребоваться модификация генераторов и использование новых параметров обработки.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы и оборудование

2.1.1 Реактивы и материалы

Для выполнения работы использованы следующие реактивы: PBS (Sigma, США), ростовая среда DMEM, ростовая среда RPMI (GIBCO, США), эмбриональная бычья сыворотка FBS (GIBCO, США), GlutaMAX™ (Invitrogen, France), раствор для открепления клеток от культурального пластика Tryple-Express (GIBCO, США), раствор антибиотиков-антимикотиков (GIBCO, США), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (MTT) (Sigma-Aldrich, США), реагент для выделения РНК «Лира» («Биолабмикс», Россия), агароза и легкоплавкая агароза (Диам, Россия), бромистый этидий (MP Biomedicals, США), акриламид (Диам, Россия), N,N'-метиленбисакриламид (ICN Biomedicals Inc., США), ТЕМЕД (Хеликон, Россия), персульфат аммония (Gerbu, Германия), маркер для белкового электрофореза с известной молекулярной массой (Thermo Scientific, Литва), ЭДТА (Gerbu, Germany), глицин (MP Biomedicals, Франция), SDS (ICN Biomedicals Inc., США), 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол (Трис) (Gerbu, Германия), соляная кислота (Реахим, Россия), β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, Германия), ингибитор протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, США), ингибитор фосфатаз Pierce Phosphatase Inhibitor (Thermo, США), бычий сывороточный альбумин BSA (Диам, Россия), хлорид натрия (Gerbu, Германия), уксусная кислота (Реахим, Россия), нитроцеллюлозная мембрана (Bio-Rad, США), NuPAGE Transfer Buffer (Life Technologies, США), субстрат пероксидазы Novex ECL (Invitrogen, США), этиловый спирт (Кемеровская фармацевтическая фабрика, Россия), препараты для наркоза: «Золетил» (Virbac, Франция), «Ксила» (Interchemie, Нидерланды), краситель двуцепочечной ДНК dsGreen (Lumiprobe, Россия), 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина диацетат (Sigma, США), хлорохина дифосфат (Sigma, США), туникамицин (Sigma, США), дитиотреитол (MP Biomedicals, США), колхицин (Sigma, США), смолы для просвечивающей электронной микроскопии: Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences, США), SPI-PON 812 (SPI Supplies, США), DDSA (Electron Microscopy Sciences, США).

Наборы и смеси: набор для проведения обратной транскрипции - полимеразной цепной реакции в режиме реального времени БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (Биолабмикс, Россия), набор для измерения концентрации общего белка в лизатах клеток Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США), набор для изучения апоптоза с Annexin V FITC,

PI (BD Biosciences Pharmingen, США), набор для исследования активации каспаз 3 и 7 (Invitrogen, США), набор для исследования потенциала митохондрий MitoScreen (JC-1) (BD, США).

Первичные антитела: поликлональные антитела IgG кролика к белку GADD45B человека (ab205252), моноклональные антитела IgG мыши к белку ATF3 человека (ab233797), моноклональные антитела IgG мыши к фосфорилированному по S139 белку γ H2AX человека (ab26350), моноклональные антитела IgG мыши к белку MDM2 человека (ab16895), моноклональные антитела IgG мыши к белку DRP1 человека (ab56788), моноклональные антитела IgG кролика к белку COX IV человека (ab202554), моноклональные антитела IgG мыши к белку LC3B человека (ab51520), моноклональные антитела IgG кролика к белку ATG5 человека (ab108327), моноклональные антитела IgG мыши к белку PINK1 (ab186303), моноклональные антитела IgG кролика к белку GPX4 человека (ab125066) (все перечисленные антитела производства Abcam, США). Моноклональные антитела IgG кролика к белку BECN1 (B6061) человека, моноклональные антитела IgG кролика к белку p62/SQSTM1 (P0067), моноклональные антитела IgG мыши к β -тубулину человека (T8328), моноклональные антитела IgG мыши к альфа-актину человека (SAB3300072) (все перечисленные антитела производства Sigma, США).

Вторичные антитела: поликлональные антитела козы к IgG мыши (G-21040) и поликлональные антитела козы к IgG кролика (G-21234), конъюгированные с пероксидазой хрена (Invitrogen, США).

Материалы для культивирования клеток: флаконы для культивирования с площадью поверхности 25 и 75 см² (TPP, Швейцария), 6- и 96-луночные планшеты для культивирования (TPP, Швейцария), планшеты E-Plates для мониторинга в режиме реального времени на приборе iCELLigence (Agilent, США).

2.1.2 Оборудование

Проточный цитофлуориметр FACS Canto II (BD, США), клеточный анализатор iCELLigence (Agilent, США), имиджинговая система Celena X (Logos biosystems, Южная Корея).

Генератор ХПС был разработан 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. Под обрабатываемый объект помещается заземленная медная пластина (Рисунок 11).

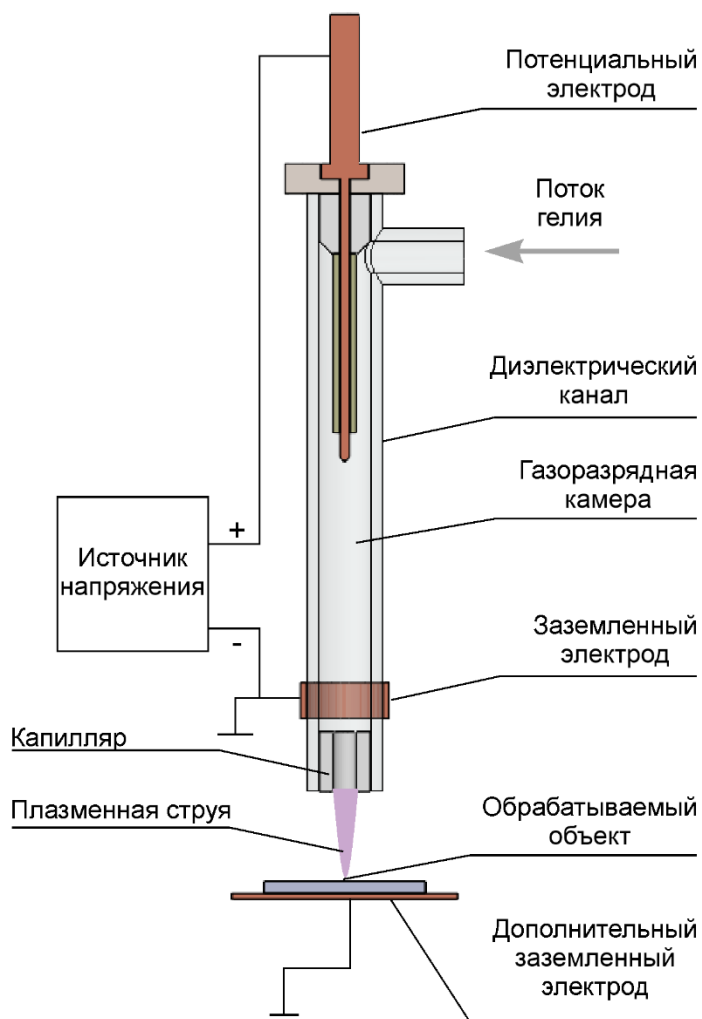


Рисунок 11 – Схема используемого в работе газоразрядного устройства.

2.1.3 Буферы и растворы

Лизирующий буфер RIPA: 1% NP-40, 150 мМ NaCl, 0.1% SDS, 50 мМ Трис-HCl, pH=7.4; ингибиторы протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, США) и ингибитор фосфатаз Pierce Phosphatase Inhibitor (Thermo, США).

ПААГ разделяющий (для белкового электрофореза): 0.3 М Трис-HCl, 13% акриламид, 0.25% N,N'-метиленабисакриламид, 0.1% SDS, pH 8.8.

ПААГ концентрирующий (для белкового электрофореза): 125 мМ Трис-HCl, 5% акриламид, 0.1% N,N'-метиленабисакриламид, 0.1% SDS, pH 6.8.

Буфер для белкового электрофореза: 25 мМ Трис-HCl (pH 8.3), 192 мМ глицин, 0.1% SDS.

Буфер для нанесения образцов (Буфер Лэммли): 50 мМ Трис-HCl, 100 мМ β-меркаптоэтанол, 1% SDS, бромфеноловый синий (75 нг/мл), ксиленцианол (50 нг/мл), pH 6.8.

ТАЕ: 40 мМ Трис, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА, pH 8.4.

Буфер А для фракционирования клеток: 10 мМ HEPES pH 7.6, 10 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 0.1 мМ ЭДТА, ингибиторы протеаз.

Буфер С для фракционирования клеток: 50 мМ HEPES pH 7.8, 50 мМ KCl, 300 мМ NaCl, 0.1 мМ ЭДТА, 10% глицерин, ингибиторы протеаз.

2.1.4 Олигонуклеотиды

Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в лаборатории синтетической биологии ИХБФМ СО РАН. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе в качестве ген-специфичных праймеров для проведения ОТ-ПЦР РВ, приведены в таблице Б.1. Специфичность праймеров была проверена при помощи сервиса Primer-BLAST [208].

2.1.5 Клеточные культуры

В работе использовали культуры клеток, перечисленные в таблице 4.

Таблица 4 – Культуры клеток, использованные в работе

Название культуры клеток	Заболевание/Тип клеток	Источник
A-549	Аденокарцинома легкого человека / эпителиальные клетки	ATCC № CCL-185
A-427	Карцинома легкого человека / эпителиальные клетки	ATCC № HTB-53
NCI-H23	Аденокарцинома легкого человека / эпителиальные клетки	ATCC № CRL-5800

Продолжение таблицы 4

Название культуры клеток	Заболевание/Тип клеток	Источник
Wi-38	Фибробласты легкого человека	Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург
MRC-5	Фибробласты легкого человека	ATCC № CCL-171
MCF-7	Аденокарцинома молочной железы человека / эпителиальные клетки	Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург
MCF-10A	Фиброкистозная болезнь молочной железы / эпителиальные клетки	Российская коллекция клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск
B16	Меланома мыши / эпителиальные клетки	ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

2.1.6 Лабораторные животные

В работе использовали 6-8-недельных самцов линии C57BL/6 средней массы 17-20 г развода вивария ИХБФМ СО РАН (Новосибирск). Животных содержали в пластиковых клетках в помещении с режимом 12 ч день, 12 ч ночь. Мыши имели свободный доступ к корму и воде.

Все эксперименты с лабораторными животными выполнены в соответствии с рекомендациями и требованиями по использованию и уходу за лабораторными животными (ECC Directive 2010/63/EU). Протоколы экспериментов были одобрены Комитетом по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 61/1 от 14 августа 2020 г.).

2.2 Методы

2.2.1 Культивирование эукариотических культур клеток

Клетки A-549, Wi-38, MCF-7, MCF-10A, B16 культивировали во флаконах для культивирования площадью 25 или 75 см² в средах DMEM (A-549, Wi-38, B16), IMDM (MCF-7, MCF-10A) в присутствии 2 mM L-глутамина, 10% FBS, 1x антибиотика-антимикотика (100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата, 0,25 мкг/мл амфотерицина). Условия культивирования: 37,0±1,0°C, атмосфера 5,0±0,5 % CO₂. Клетки в состоянии монослоя открепляли от подложки добавлением 400 мкл раствора трипсина (Tryple Express), предварительно промывая добавлением 0,5-1 мл раствора PBS. Открепленные клетки разбавляли соответствующей средой в соотношении 1:3 – 1:5 (v:v) для продолжения культивирования.

2.2.2 Обработка клеток ХПС

Клетки культивировали в 96- или 6-луночных планшетах в количестве 5×10^3 – 10×10^3 клеток на лунку и 180×10^3 – 400×10^3 соответственно. Объем среды составлял 100 мкл/лунку в случае 96-луночного и 3 мл/лунку в случае 6-луночного планшета. Расстояние от поверхности среды до дна лунки во всех случаях составляло 3 мм. По достижении 70-80% монослоя обрабатывали планшеты холодной плазменной струей при соответствующих каждому эксперименту параметрах. Планшеты помещали под струю холодной плазмы так, чтобы расстояние до поверхности среды составляло 25 мм. В случае использования 96-луночных планшетов струю плазмы направляли в центр лунки, в случае 6-луночных планшетов планшет перемещали под струей при помощи автоматизированного устройства так, чтобы струя плазмы за время обработки перемещалась зигзагообразно по всей площади лунки (Рисунок 12)

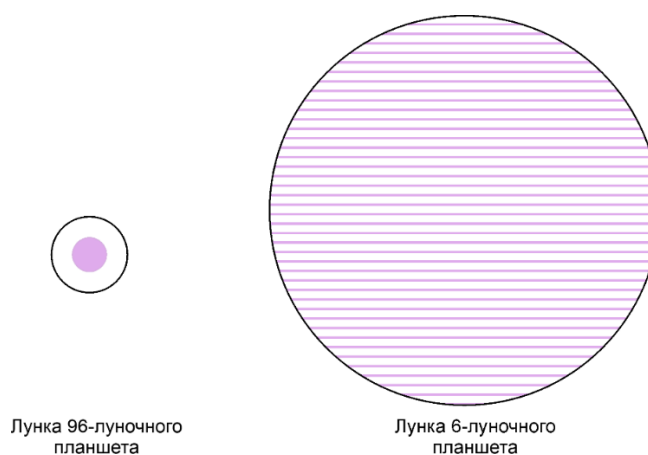


Рисунок 12 – Схематичное представление обрабатываемой ХПС области в лунках 96-луночного и 6-луночного планшетов. Обрабатываемая область обозначена розовым цветом

Время обработки составляло 5-240 с/лунку 96-луночного планшета и 5-10 мин/лунку 6-луночного планшета. Для экспериментов, в которых требовалось относительно большое количество клеток (вестерн-блоты, ПЦР и т.п.) производили обработку клеток в 6-луночных планшетах, предварительно определив продолжительность обработки, соответствующую обработке лунок 96-луночного планшета (Рисунок А.5). После облучения клетки продолжали культивировать в стандартных условиях.

2.2.3 Оценка жизнеспособности клеток (МТТ-тест)

Клетки после обработки культивировали в стандартных условиях в течение 24 часов, после чего заменяли среду на 200 мкл среды RPMI без сыворотки, содержащую МТТ (0,25 мг/мл), и инкубировали 4 ч при 37°C. Удаляли среду из лунок и добавляли по 150 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность раствора измеряли на многоканальном спектрофотометре Apollo LB912 (Berthold Technologies, Германия) при $\lambda=570$ нм. Долю живых клеток (в %) рассчитывали, как отношение показателя оптической плотности экспериментального образца к показателю контрольного образца. Эксперименты проводили в трех повторах. Продолжительность обработки (с), при которой происходит гибель 50% клеток, IT_{50} – показатель, аналогичный широко используемому IC_{50} – рассчитывали при помощи нелинейной регрессии в программном обеспечении GraphPad Prism 8 (Dotmatics, США). Для представления использовали значение с наилучшим соответствием (best fit). Индекс селективности рассчитывали, как отношение IT_{50} нетрансформированных клеток к IT_{50} опухолевых клеток.

2.2.4 Оценка пролиферации клеток в реальном времени

Для оценки пролиферации клеток в режиме реального времени использовали клеточный анализатор iCELLigence RTCA (Agilent Technologies, США). Клетки (30000 кл/лунку) высаживали на 8-луночные планшеты E-Plates со встроенными микроэлектронными датчиками в общем объеме среды, равном 500 мкл, помещали планшеты в прибор.

Через 24 ч вынимали планшеты из прибора и проводили прямую обработку ХПС. После чего планшеты помещали обратно в прибор и культивировали в стандартных условиях. Сгенерированные автоматические кривые роста клеток обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения RTCA 1.2 (Agilent Technologies, США). Эксперименты по оценке пролиферации в реальном времени проводили в двух повторах.

2.2.5 Анализ активации апоптоза при помощи системы аннексин V-йодид пропидия

Клетки открепляли от культурального пластика через 6 или 24 ч после обработки ХПС. 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). Эксперименты проводили в трех повторах. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (BD, США).

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

Клетки через 0,5-4 ч после обработки ХПС клетки открепляли от подложки при помощи реагента Tryple Express и инкубировали в 10 мкМ растворе 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина диацетата (H₂DCFDA) в PBS в течение 30 мин при комнатной температуре. Образцы анализировали на проточном цитометре FACS CantoII, флуоресценцию детектировали в канале FITC (535 нм). Анализ проводили с тремя повторами. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (BD, США).

2.2.7 Определение концентраций внеклеточных нитрит-ионов в среде после обработки ХПС

Через 0,5-4 ч после обработки ХПС из лунок планшета отбирали по 50 мкл культуральной среды. Анализировали концентрацию нитрит-ионов методом Грисса при помощи набора Griess Reagent System (Promega, США). Для этого добавляли в лунки по 50 мкл раствора сульфаниламида, инкубировали в 10 мин при комнатной температуре в темноте. После этого добавляли в лунки по 50 мкл раствора N-(1-нафтил)этилендиамин дигидрохлорида (NED). Инкубировали 10 мин при комнатной температуре в темноте, после чего измеряли оптическую плотность раствора при 570 нм. Стандартные растворы готовили путем разведения 0,1 М раствора в среде DMEM. Эксперимент проводили в трех повторах.

2.2.8 Выделение суммарной РНК из клеток

Клетки в 96- или 6-луночных планшетах после облучения инкубировали в течение времени, указанного для каждого эксперимента. Отбирали среду, добавляли по 50 мкл реагента «Лира»/лунку 96-луночного и по 500 мкл реагента «Лира»/лунку 6-луночного планшета. Инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре для лизиса клеток. Выделение и очистку суммарной РНК из клеток производили с использованием набора LRU-100-50 (ООО «Биолабмикс», Россия). Лизаты клеток центрифугировали при 10000×g в течение 10 минут при 4°C. Супернатант переносили в чистую пробирку. Добавляли хлороформ из расчета 200 мкл хлороформа на 1 мл «Лир». Встряхивали пробирки и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Центрифугировали образцы при 10000 g в течение 10 минут при 4°C. Переносили верхнюю водную фазу в чистую пробирку, добавляли равный объем 96% этанола, перемешивали и переносили на колонку с кремниевой мембраной. Центрифугировали 30 с при 10000×g при комнатной температуре. Удаляли фильтрат, наносили на колонки буфер для промывки, центрифугировали 30 с при 10000×g. Повторяли промывку. После этого центрифугировали образцы 3 мин при 10000×g при комнатной температуре. Элюцию проводили в 50 мкл буфера для элюции. Чистоту и качество РНК после выделения оценивали по соотношению оптических плотностей A260/A280, измеренных на спектрофотометре.

Образцы суммарной РНК перед дальнейшим использованием в ферментативных реакциях обрабатывали ДНКазой I (Molecular probes, США) в соответствии с протоколом производителя.

Концентрацию суммарной РНК определяли с использованием набора Qubit™ RNA Broad Range Assay Kit (Invitrogen, США) и флуориметра Qubit (Invitrogen, США).

2.2.9 Анализ транскриптома клеток

Образцы суммарной РНК в двух повторах были переданы в Междисциплинарный центр коллективного пользования Казанского федерального университета (Казань, Россия) для секвенирования транскриптома клеток. Секвенирование проводилось на приборе Illumina 1500 NextSeq.

Биоинформатический анализ данных был проведен в двух вариантах:

1) Последовательности адаптеров были удалены при помощи Trimmomatic v0.32 [209], последовательности рРНК, тРНК, мРНК, SINE-, LINE-, а также повторяющиеся последовательности генома были удалены при помощи bowtie2 [210]. Картирование прочтений на сборку генома/транскриптома человека GRCh37/hg19 (NCBI RefSeq) было проведено с помощью STAR v2.7.1a [211]. Анализ качества картирования и подсчет картированных прочтений произведен при помощи QoRTs v1.3.6 [212]. Анализ дифференциальной экспрессии генов произведен при помощи DESeq2 1.36.0 [213] (версия R 4.1.3, Bioconductor – 3.14).

2) Удаление адаптеров и фильтрация прочтений произведена при помощи fastp v0.23.2 [214], псевдовыравнивание прочтений на транскриптом человека GRCh38 выполнено при помощи kallisto 0.51.1 [215]. Анализ дифференциальной экспрессии генов произведен при помощи DESeq2 1.38.0 (версия R 4.2.3, Bioconductor – 3.16).

Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов проведен при помощи базы данных Enrichr [216].

2.2.10 Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Для проведения ОТ-ПЦР РВ использовали коммерчески доступный набор БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (Биолабмикс, Россия). Для проведения одной реакции использовали 40 нг суммарной РНК, очищенной от ДНК, а также 300 нМ прямого и обратного праймеров. Реакцию проводили на амплификаторе CFX96 (BioRad, США) с использованием программы: обратная транскрипция (45°C 30 мин), предварительная денатурация (95°C 5 мин), далее 30-40 циклов денатурации (95°C 10 с), отжига праймеров (60-63 °C 10 с), элонгации (72°C 10 с). Эксперимент проводили в 4 повторах. В качестве

референсных генов использовались гены *B2M*, *HPRT1*, *GAPDH*, относительное количество транскриптов нормализовали на уровни референсных генов в соответствующих образцах (метод $\Delta\Delta C_q$). Стабильность референсных генов оценивалась при помощи инструмента RefFinder, включающего в себя оценку стабильности алгоритмами BestKeeper, Normfinder, geNorm [217]. Значения M-value, рассчитанные при помощи алгоритма geNorm для генов *B2M*, *HPRT1*, *GAPDH* составили 0.778, 0.778, 0.975 соответственно, значения стабильности V, рассчитанные при помощи NormFinder, 0.125, 0.768, 0.932 соответственно, стандартные отклонения, рассчитанные при помощи BestKeeper, 0.421, 0.241, 0.738 соответственно. Эффективности праймеров оценивали при помощи инструмента LinRegPCR [218], для всех пар праймеров эффективности составляли не менее 90%.

2.2.11 Приготовление лизатов клеток и измерение концентрации белка в лизатах

Из лунок культурального планшета удаляли среду, промывали клетки PBS, открепляли от подложки добавлением раствора Tryple Express, инактивировали реагент добавлением PBS, переносили суспензию клеток в пробирки для центрифугирования. Осаждали центрифугированием при 100 g в течение 5 мин. Удаляли супернатант, добавляли к клеткам 50 мкл буфера для лизиса RIPA. Инкубировали образцы 30 мин на льду, перемешивая. Центрифугировали образцы при 12000 g 10 мин при +4°C. Супернатант переносили в новые пробирки и хранили лизаты при -20°C. Концентрацию белка в лизатах определяли с помощью метода Лоури с использованием набора Modified Lowry Protein Assay Kit и спектрофотометра (оптическая плотность растворов при 750 нм). Для построения калибровочных кривых использовали растворы бычьего сывороточного альбумина (0,2-1 мг/мл). Концентрацию общего белка рассчитывали по калибровочным кривым.

2.2.12 Электрофорез лизатов клеток в полиакриламидном геле

Лизаты клеток смешивали с буфером для нанесения образцов на гель, инкубировали 10 мин при 96°C. Лизаты наносили на гель в количестве 15-30 мкг суммарного белка на дорожку. Разделение белков в электрическом поле проводили электрофорезом по Лэммли в ПААГ (5% концентрирующий ПААГ: 110 В/см, 10% разделяющий ПААГ: 150 В/см) в буфере ТГ.

2.2.13 Электроперенос белков на мембрану и вестерн-блот

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану производили в течение 1 ч в камере для электропереноса при напряжении 150 В в буфере для электропереноса, который готовили путем разбавления 50 мл коммерчески доступного NuPAGE Transfer Buffer в 1150 мл H₂O mQ.

После электропереноса нитроцеллюлозную мембрану помещали в блокирующий буфер и инкубировали в течении 1 ч на роторном шейкере. После инкубации к мембране добавляли промывочный буфер и промывали 3 раза по 5 минут на роторном шейкере. Далее вносили раствор первичных антител в PBST (PBS + 0,1% Tween-20) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре или ночь при 4°C с постоянным перемешиванием. Затем первичные антитела сливали, нитроцеллюлозную мембрану промывали буфером PBST и добавляли раствор вторичных антител в блокировочном буфере (5% BSA в буфере PBST) и инкубировали 1 ч с перемешиванием. Далее повторяли серию промывок и инкубировали 1 мин с хемилюминесцентным субстратом пероксидазы NovexTMECL и визуализировали сигнал на детекторе хемилюминесценции Amersham Imager 600. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения для анализа изображений Gel-Analyzer версии 23.1. Эксперименты проводили в двух повторах.

2.2.14 Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла

Через 24 ч после воздействия ХПС клетки открепляли от пластиковой подложки с помощью Tryple Express, центрифугировали при 100 g в течении 5 минут. Далее клетки промывали холодным PBS и фиксировали ледяным 70% метанолом. Клетки промывали и ресуспендировали в PBS, содержащим 100 мкг/мл РНКазы А (Magen, Китай). После 5 минутной инкубации к клеткам добавляли 100 мкл раствора пропидия йодида (50 мкг/мл) в PBS, инкубировали 15-20 минут и проводили оценку распределения клеток по фазам клеточного цикла с использованием проточного цитометра FACSCanto II. Флуоресцентный сигнал отслеживали в канале PE, линейная шкала. Эксперименты проводили в двух повторах. Автоматический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения FlowJo v10.10 с использованием модели Уотсона.

2.2.15 Анализ повреждения ДНК клеток методом ДНК-комет

Клетки после обработки ХПС открепляли от пластиковой подложки, смешивали суспензию клеток с расплавленной легкоплавкой агарозой (1% в PBS), имеющей температуру 37°C. Переносили суспензию клеток в агарозе на охлажденные микроскопические слайды, предварительно покрытые 1% агарозой, накрывали покровным стеклом. После застывания агарозы убирали покровные стекла, помещали слайды на 1 ч в холодный (4°C) лизирующий буфер следующего состава: 2,5М NaCl, 100 мМ динатриевой соли ЭДТА, 10 мМ Трис, 0,2М NaOH, pH = 10,5, 1 % ДМСО, 1 % Triton X-100. После лизиса промывали слайды водой и помещали на 30 мин в холодный (4°C) буфер для электрофореза (300 мМ NaOH, 1мМ ЭДТА, 1% ДМСО). Переносили слайды в камеру для электрофореза. Проводили электрофорез в течение 30 мин при 1В/см. Промывали слайды водой в течение 5 мин 3 раза. Наносили на слайды раствор для окрашивания (dsGreen в H₂O 1:10000), инкубировали в темноте при комнатной температуре 20 мин. Промывали слайды водой и высушивали в течение не менее 30 мин. Фотографирование слайдов проводили с помощью имиджинговой системы Celena X, снимали не менее 40 полей зрения на слайд. Эксперименты проводили в двух повторах. Обработку изображений производили с помощью программного обеспечения Celena Cell Analyzer. Определяли интенсивность флуоресценции головы кометы и всей кометы. Долю ДНК в хвосте кометы определяли как $(1 - (\text{интенсивность флуоресценции головы кометы} / \text{интенсивность флуоресценции кометы})) \times 100\%$. Для статистического анализа и графического представления выравнивали количество подсчитанных комет по минимальному числу в группе.

2.2.16 Просвечивающая электронная микроскопия

Клетки после обработки ХПС открепляли от подложки при помощи реагента Tryple Express. Центрифугировали при 100 g 5 мин и фиксировали осадки клеток раствором 4% параформальдегида в среде DMEM, после этого промывали средой и дополнительно фиксировали 1% раствором тетраоксида осмия. Затем дегидратировали путем выдерживания в растворах этанола с повышением концентрации от 30 до 96%, после чего промывали ацетон 5 раз в течение 15 мин. После этого выдерживали осадки в смеси смол (Araldite 502:SPI-PON 812: DDSA в соотношении 1:1.5:3.7) и ацетона (1:1) в течение 24 часов. Сушили осадки на воздухе, помещали в конические формы и заливали смолой в смеси с катализатором DMP-30. Из полученных блоков на ультрамикротоме

готовили ультратонкие срезы, которые после контрастирования ацетатом уранила и цитратом свинца анализировали на электронном микроскопе JEM 1400 (JEOL, Япония).

2.2.17 Получение лизатов митохондрий

Клетки открепляли от подложки, центрифугировали 200 g 5 мин, промывали PBS. Ресуспендировали в 100 мкл холодного буфера А, инкубировали суспензию на льду 5 мин при 4°C. Добавляли 1% раствор NP-40 в буфере А до конечной концентрации 0,012%, перемешивали пипетированием. Инкубировали 1 мин при 4°C. Центрифугировали образцы при 16000 g 1 мин. Удаляли супернатант (цитозольная фракция), ресуспендировали осадок в 500 мкл холодного буфера А, центрифугировали при 16000 g 15 с. Удаляли супернатант, ресуспендировали осадок в 40 мкл буфера С, инкубировали на льду в течение 30 мин. После этого пропускали суспензию 10 раз через иглу 30G шприца. Центрифугировали при 16000 g 5 мин. Удаляли супернатант (фракция ядер). Промывали осадок дважды 500 мкл холодного PBS с центрифугировали при 16000 g в течение 1 мин. Добавляли к осадку 30 мкл буфера Лэммли и инкубировали при 95°C 10 мин.

2.2.18 Исследование деполяризации мембран митохондрий

Клетки после обработки ХПС открепляли от подложки, центрифугировали 100 g 5 мин, удаляли супернатант. Осадок ресуспендировали в растворе реагента JC-1 в буфере из набора MitoScreen (BD, США). Инкубировали 15 мин при 37°C в темноте. Промывали буфером 3 раза с центрифугированием в течение 5 мин при 100 g. Анализировали образцы на проточном цитометре FACSCanto II. При возбуждении флуоресценции лазером с длиной волны испускаемого света 488 нм, флуоресценция агрегатов JC-1 наблюдалась в канале PE (максимум испускания 590 нм), мономеров – в канале FITC (максимум испускания 527 нм). Эксперименты проводили в двух повторах. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (BD, США).

2.2.19 Определение активации каспаз 3 и 7

Клетки после обработки ХПС открепляли от подложки, центрифугировали 100 g 5 мин, удаляли супернатант. Добавляли к клеткам рабочий раствор компонента А набора CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (Invitrogen, США) с концентрацией 500 нМ. Инкубировали 25 мин при 37°C в темноте. Анализировали флуоресценцию на

проточном цитометре FACSCanto II в канале FITC. Эксперименты проводили в трех повторах. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (BD, США).

2.2.20 Анализ перекисного окисления липидов

К клеткам после обработки ХПС добавляли краситель BODIPYTM 581/591 C11 (Invitrogen, США) до конечной концентрации 2,5 мкМ. Инкубировали 30 мин в стандартных условиях культивирования клеток. Далее клетки промывали, открепляли от подложки и анализировали флуоресценцию на проточном цитометре FACSCanto II. Краситель встраивается в мембраны клеток, при этом его восстановленная форма флуоресцирует в канале PE (максимум испускания 590 нм), а окисленная форма – в канале FITC (максимум испускания 510 нм). Эксперименты проводили в двух повторах. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (BD, США).

2.2.21 Оценка противоопухолевой эффективности *in vivo*

Мышам линии C57BL/6 трансплантировали подкожно клетки меланомы мыши B16 в количестве 170 тыс. клеток/мышь в 100 мкл физиологического раствора. Опухоли измеряли при помощи штангенциркуля. Объем рассчитывали по формуле: $V = 0.4 \times L \times W^2$, где L – больший диаметр, W – меньший диаметр опухоли. Индекс торможения опухоли рассчитывали по формуле: $((\Delta C - \Delta T) / \Delta C) \times 100\%$, где ΔC и ΔT – разница между средними значениями объемов в день, для которого производится расчет, и первым днем для контрольной и экспериментальной группы соответственно.

Перед обработкой ХПС у всех животных удаляли шерсть в области опухоли. Обработку опухолей ХПС начинали при достижении опухолями объемов 40 ± 3 мм³. Животных анестезировали введением 100 мкл комбинации препаратов «Золетил» и «Ксила» внутривентрально. Концентрации тилетамина гидрохлорида и золазепама гидрохлорида составляли 3,75 мг/мл, ксилазина гидрохлорида – 1,2 мг/мл. Опухоли обрабатывали по 2 мин, равномерно обрабатывая всю поверхность кожи над опухолью.

Температуру кожи в зоне обработки контролировали при помощи тепловизора Testo 872 (Testo AG, Германия).

Хлорохина дифосфат в физиологическом растворе вводили внутривентрально в количестве 50 мг на 1 кг веса в объеме 300 мкл. Количество мышей в эксперименте

составляло: 5 в контрольной группе, по 6 в группах монообработки ХПС и комбинированной обработки хлорохином и ХПС.

2.2.22 Статистический анализ данных

Для определения значимости полученных результатов проводили статистический анализ данных с использованием критерия Манна-Уитни при попарных сравнениях групп. Для экспериментов, в которых проводилось одновременное сравнение нескольких экспериментальных групп, использовался критерий Краскелла-Уоллиса, поправка на множественные сравнения выполнялась по методу Данна. В качестве наибольшей вероятности ошибки первого рода было принято значение 5%, т.е. различия считали значимыми при $p < 0.05$. Анализ данных производили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 8 (Dotmatics, США).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании проведенных ранее экспериментов для данной работы были выбраны следующие режимы генерации ХПС в гелии: 1) режим с синусоидальным напряжением, амплитудой 3,5 кВ, частотой 52 кГц и скоростью гелия 9 л/мин; 2) режим с импульсным напряжением (положительные однонаправленные импульсы) с амплитудой 4,2 кВ и частотой 30 кГц, скорость гелия 9 л/мин. В экспериментах, описанных в пунктах 3.1 – 3.4.6 для обработки использован режим 1.

3.1 Определение условий генерации ХПС и обработки, обеспечивающих преимущественную гибель опухолевых клеток

На первом этапе, основываясь на данных математического моделирования, проведенного д.ф.-м.н. Швейгерт И.В., оценивали влияние частоты тока на жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого А-549 после обработки клеток ХПС. Клетки обрабатывали ХПС в гелии в течение 60 и 120 с синусоидальным напряжением, амплитудой 3,5 кВ и скоростью гелия 9 л/мин. Использовали 3 режима с разной частотой: 13, 20 и 52 кГц. Результаты МТТ-теста, проведенного через 24 ч после обработки клеток, представлены на рисунке 13.

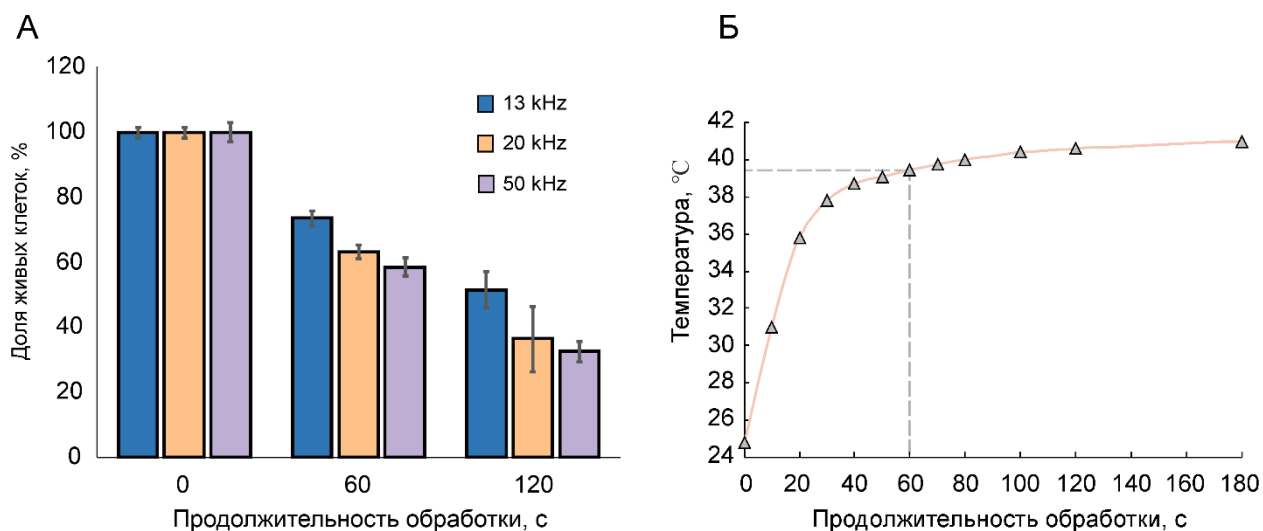


Рисунок 13 – Подбор параметров обработки клеток ХПС. А – жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого А-549 через 24 ч после обработки ХПС, генерируемой в режимах с разной частотой, $U = 3,5$ кВ, скорость гелия 9 л/мин. Результаты МТТ-теста представлены как среднее значение доли живых клеток, рассчитанное по двум повторам $\pm$ стандартное отклонение. Б – изменение температуры поверхности диэлектрической пластины из оксида алюминия в области обработки при облучении ХПС, работающей в режиме $U = 3,5$ кВ, $f = 52$ кГц, скорость гелия 9 л/мин. Данные получены д.ф.-м.н. Закревским Д.Э. и Милахиной Е.В. (ИФП СО РАН).

Можно видеть, что режим с частотой 52 кГц оказывает наибольший цитотоксический эффект на клетки А-549 (Рисунок 13А). Согласно данным расчетов, при этой частоте наблюдаются более высокие энергии и плотность электронов. Контроль температуры обрабатываемого объекта проведен сотрудниками ИФП СО РАН д.ф.-м.н. Закревским Д.Э. и Милахиной Е.В. на примере диэлектрической пластины из оксида алюминия. Исследования показали (Рисунок 13Б), что температура поверхности быстро увеличивается в течение первых 30 с обработки, далее остается относительно стабильной. При обработке в течение 60 с температура поверхности не превышает 40°C. Исследования, проведенные с использованием культуральной среды, показали изменение температуры среды не более, чем на 1°C, при обработке в течение 1-2 минут, что обусловлено значительно большей теплоемкостью воды. Дальнейшие эксперименты с использованием синусоидального напряжения проводили при 52 кГц.

Для исследования чувствительности клеток легкого к действию ХПС, генерируемой в синусоидальном режиме, использовали клеточные линии карциномы легкого человека А-549, А-427 и NCI-H23, а также фибробласты легкого человека Wi-38 и MRC-5. Жизнеспособность клеток оценивали через 24 ч после обработки методом МТТ-теста.

Клетки обрабатывали в течение 5-120 с, оставляя остальные параметры неизменными. Такой подход позволил говорить о времени обработки как о дозе облучения, относительно которой проводили расчет значения IT_{50} – времени обработки, при котором наблюдалась гибель 50% клеток (Рисунок 14).

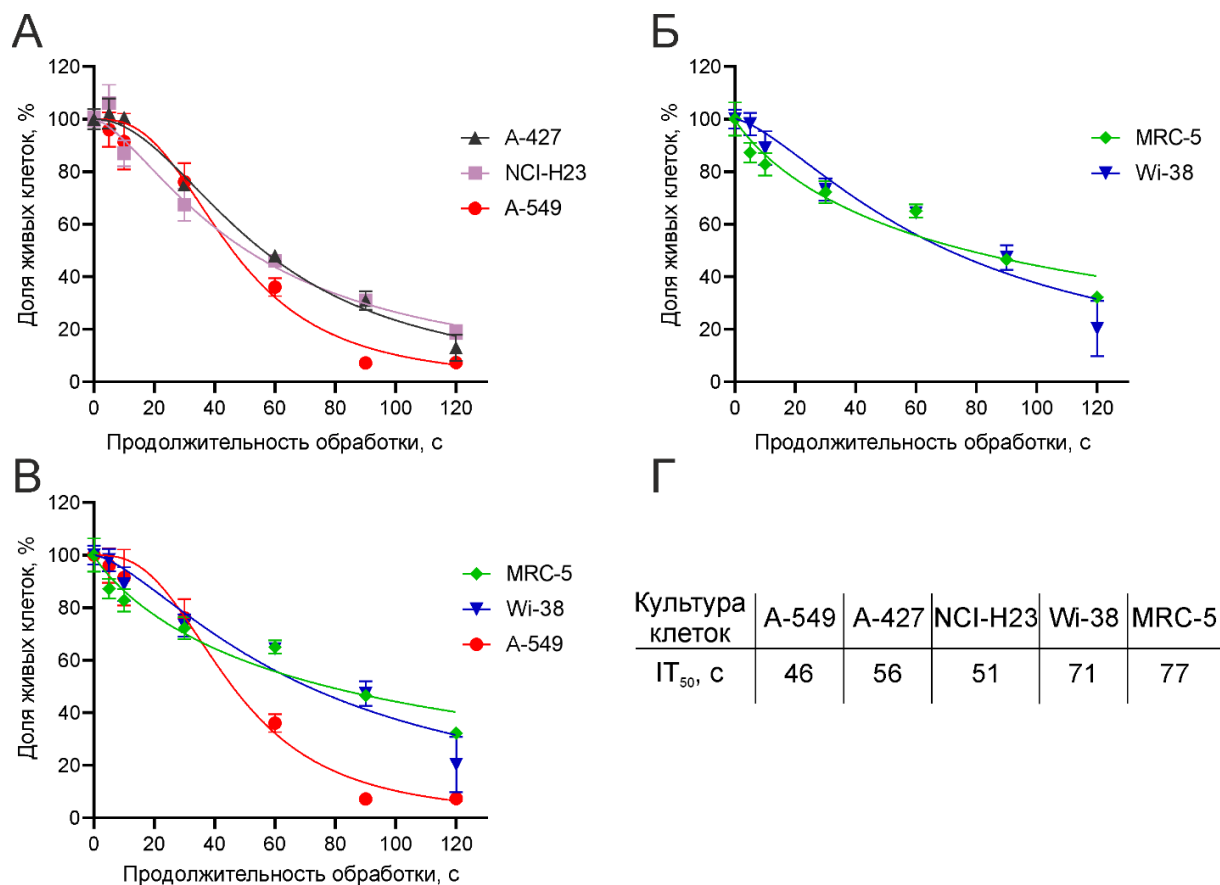


Рисунок 14 – Влияние ХПС на жизнеспособность опухолевых и нетрансформированных клеток легкого человека. А – результаты оценки жизнеспособности опухолевых клеток легкого человека методом МТТ-теста через 24 ч после обработки ХПС. Б – результаты оценки жизнеспособности нетрансформированных фибробластов легкого человека методом МТТ-теста через 24 ч после обработки ХПС. В – наложение кривых жизнеспособности клеток аденокарциномы легкого А-549 и фибробластов легкого. Г – значения IT_{50} для клеток исследуемых культур. Результаты МТТ-теста представлены как среднее значение доли живых клеток, рассчитанное по трем повторам $\pm$ стандартное отклонение.

Обработка клеток ХПС вызывает дозозависимое снижение жизнеспособности как опухолевых, так и здоровых клеток. Среди опухолевых клеток (Рисунок 14А) наибольшую чувствительность проявляют клетки культуры А-549 ($IT_{50} = 46$ с), наименьшую – А-427 ($IT_{50} = 56$ с). Обработка продолжительностью 120 с и более приводит к полной гибели

клеток всех культур. Фибробласты легкого проявляли меньшую чувствительность к обработке, чем опухолевые клетки (Рисунок 14Б). Так, для клеток культуры Wi-38 IT_{50} составляет 71 с, для клеток культуры MRC-5 – $IT_{50} = 77$ с. Причем индекс селективности обработки ХПС, рассчитанный для пары Wi-38 – А-549, составил 1,5, для пары MRC-5 – А-549 – 1,7.

Кроме того, анализировали изменение морфологии клеток при помощи световой микроскопии (Рисунок 15А), а также исследовали пролиферацию клеток аденокарциномы легкого А-549 в режиме реального времени на протяжении 48 часов после обработки (Рисунок 15Б).

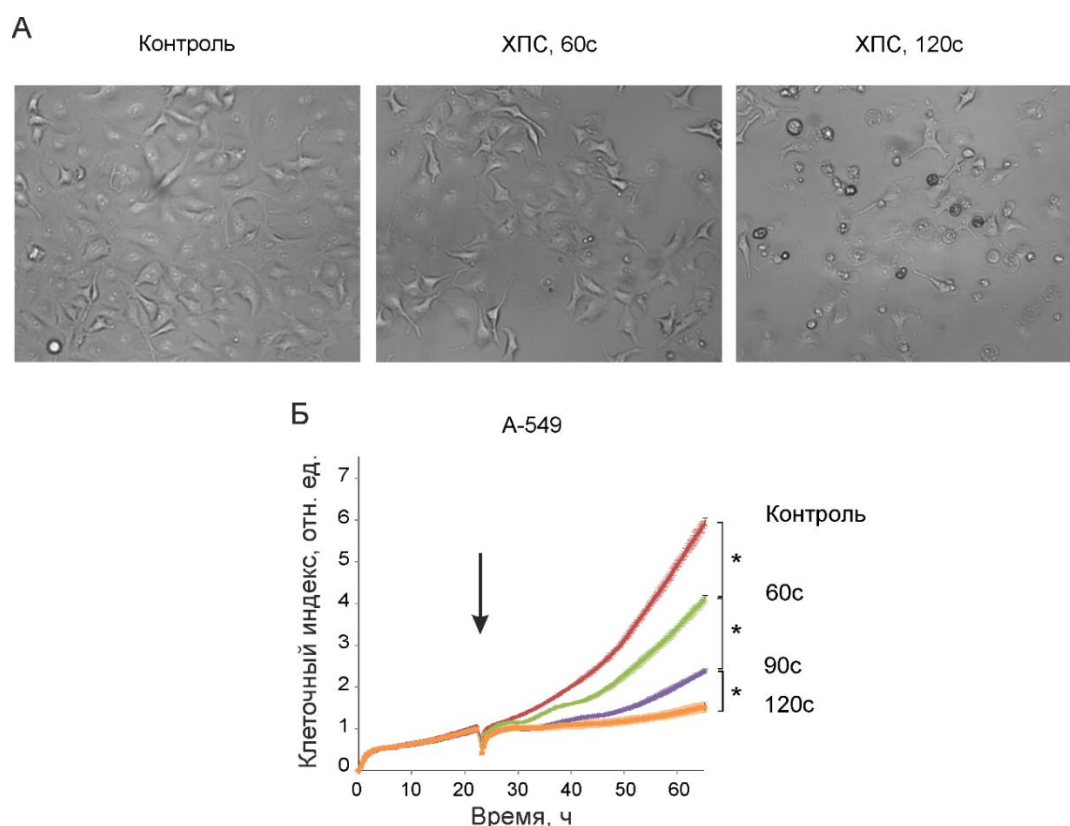


Рисунок 15 – Изменение морфологии клеток через 24 ч после обработки ХПС (А) и пролиферация клеток аденокарциномы легкого А-549 после обработки ХПС (Б). Стрелка указывает момент обработки ХПС. Данные получены при помощи анализатора в режиме реального времени iCelligence. Результаты представлены как среднее значение клеточного индекса, рассчитанное по двум повторам $\pm$ стандартное отклонение. Статистическая значимость обозначена как $*p \leq 0.05$, тест Манна-Уитни.

Световая микроскопия показывает изменения монослоя клеток аденокарциномы легкого А-549 в зависимости от дозы: разрыхление монослоя с появлением отдельных открепленных округлившихся клеток при 60 с обработки, а дальнейшее увеличение дозы

до 120 с обработки приводит к массовому откреплению клеток от подложки и появлению округлых мелких мембранных структур, подобных апоптотическим тельцам (Рисунок 15А).

Исследование пролиферации клеток культуры А-549 после обработки ХПС в режиме реального времени (Рисунок 15Б) подтверждает дозозависимое снижение пролиферации, и кроме того, показывает цитостатический характер воздействия: обработка в течение 30 с приводит к замедлению роста клеток, обработка в течение 60 и 120 с останавливает пролиферацию клеток на первые 24 ч после обработки, далее наблюдается слабый рост клеточного индекса, что отражает возобновление слабой пролиферативной активности клеток. Облучение в течение 120 с ведет к полному отсутствию пролиферирующих клеток.

Аналогичное исследование возможности селективной индукции гибели клеток проводили на паре культур молочной железы человека: на клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и эпителиальных клетках молочной железы человека, полученные от пациента с фибротическими изменениями – MCF-10A (условно здоровые клетки по отношению к опухолевым) (Рисунок 16А, Б).

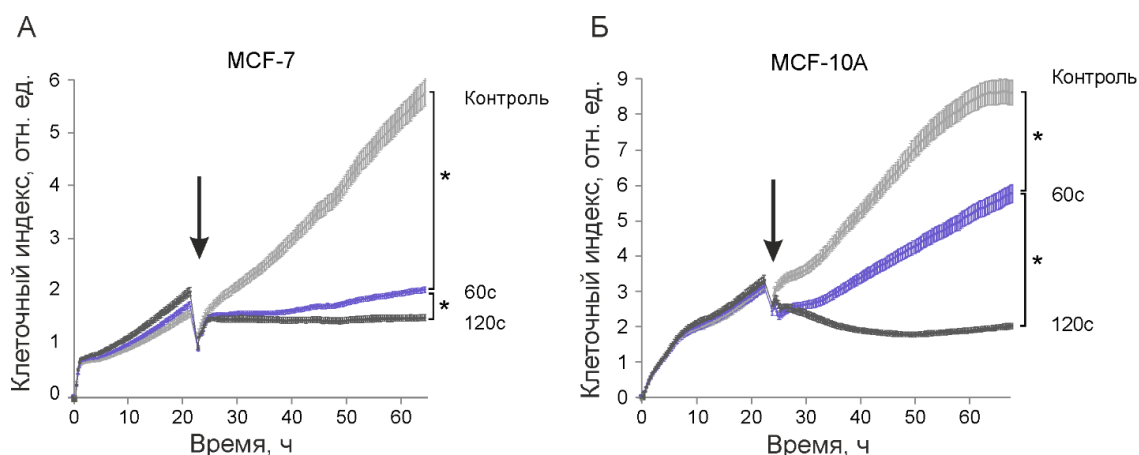


Рисунок 16 – Влияние обработки ХПС на пролиферацию клеток молочной железы человека. А – клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7, Б – нетрансформированные клетки молочной железы MCF-10A. Данные получены при помощи анализатора в режиме реального времени iCelligence. Результаты представлены как среднее значение клеточного индекса, рассчитанное по двум повторам $\pm$ стандартное отклонение. Стрелка указывает момент обработки ХПС. Статистическая значимость обозначена как * $p \leq 0.05$, тест Манна-Уитни.

Из данных рисунка 16 видно, что обработка ХПС в течение 60 с приводит к уменьшению клеточного индекса сразу после обработки, т.е. вызывает гибель и/или

открепление от подложки значительной части клеток в случае клеток культуры MCF-7. Через примерно 12 часов выжившие клетки возобновляют пролиферативную активность. Обработка в течение 120 с также приводит к гибели клеток и полностью останавливает пролиферацию клеток.

В случае клеток неопухолевого происхождения можно наблюдать менее выраженное падение клеточного индекса для обработки в течение 60 с и гибель большей части клеток для обработки в течение 120 с.

Для дальнейших экспериментов была выбрана пара культур – клетки аденокарциномы легкого A-549 и фибробласты легкого Wi-38. Такой выбор обусловлен широким использованием культуры A-549 в работах других исследователей, что делает возможным сравнение данных, полученных в разных условиях и на разных установках.

3.2 Динамика внутриклеточных и внеклеточных активных форм кислорода и азота после воздействия ХПС

Основным фактором, определяющим биологические эффекты холодной плазмы, являются активные формы кислорода и азота. Их состав может быть различным при разных параметрах газового разряда и условиях окружающей среды. При этом, как было отмечено в обзоре литературы, генерируемые в потоке ХПС частицы претерпевают значительные превращения при взаимодействии с жидкой фазой культуральной среды и молекулами, присутствующими в ее составе. Качественное и количественное определение состава АФКА в среде и внутри клеток представляет собой трудоемкую задачу из-за сложного молекулярного состава, поэтому обычно ограничиваются определением концентраций АФКА с относительно продолжительным временем жизни. Примерами могут служить пероксид водорода, нитрит- и нитрат-ионы. Кроме того, в ряде случаев можно получить оценку суммарного содержания АФКА в среде или в клетках (пункт 1.5 обзора литературы).

3.2.1 Динамика концентраций внеклеточных нитрит-ионов в культуральной среде клеток после обработки ХПС

Взаимодействие струи холодной плазмы с воздухом и, далее, с культуральной средой приводит к окислению азота с формированием его оксидов, а также нитрит- и нитрат-ионов.

Концентрацию внеклеточных нитрит-ионов в среде после обработки оценивали методом Грисса через 0,5 – 4 ч после обработки ХПС в течение 1 или 2 минут (Рисунок 17).

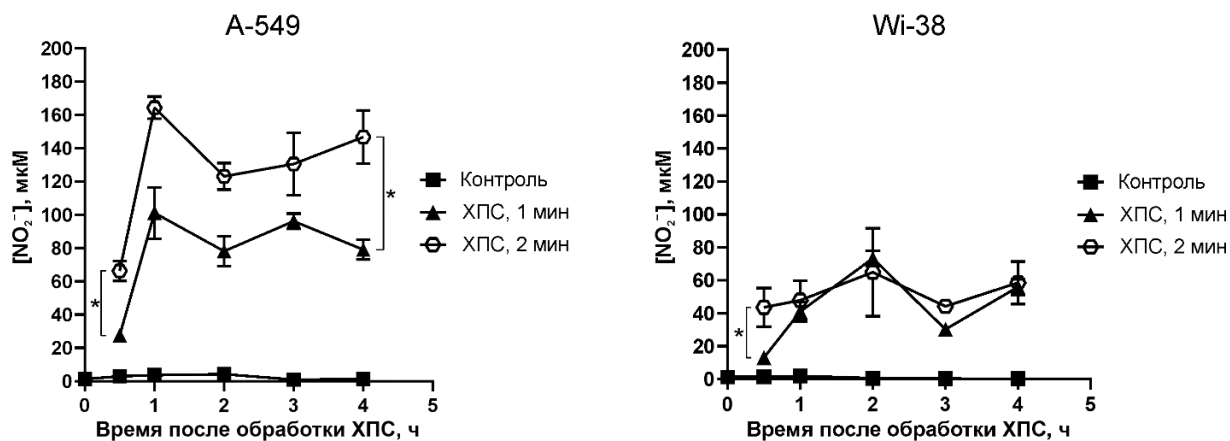


Рисунок 17 – Динамика концентрации нитрит-ионов в культуральной среде клеток после обработки ХПС для клеток аденокарциномы легкого человека А-549 (слева) и фибробластов легкого человека Wi-38 (справа). Данные количественного спектрофотометрического определения нитрит-ионов методом Грисса. Результаты представлены как среднее значение концентраций, рассчитанное по трем повторам ± стандартное отклонение. Статистическая значимость обозначена как * $p \leq 0.05$, тест Манна-Уитни.

Обработка ХПС ведет к увеличению концентрации NO₂⁻ в культуральной среде как опухолевых, так и здоровых клеток. В случае аденокарциномы легкого А-549 большая доза облучения ведет к большему увеличению NO₂⁻, и максимальное значение концентрации наблюдается через 1 ч после облучения – 100 мкМ и 160 мкМ для 1 и 2 мин, соответственно. Далее, концентрация NO₂⁻ снижается, но остается повышенной в течение наблюдаемого периода.

В случае среды от фибробластов легкого Wi-38, наблюдается рост концентраций нитрит-ионов в первые 2 ч после обработки ХПС до 60 мкМ с последующим снижением. Различие в концентрациях NO₂⁻ для двух доз облучения детектируется только через 30 мин после воздействия. Таким образом, различие в повышении внеклеточного NO₂⁻ для опухолевых и здоровых клеток составляет около 3-х раз.

Несмотря на количественные различия, характер изменения концентраций нитрит-ионов в среде обработанных ХПС клеток обеих культур проявляет общую закономерность.

Так, первоначальный рост концентрации (через 1 ч для А-549 и 2 ч для Wi-38) вероятнее всего связан с образованием первичных нитрит-ионов при взаимодействии плазмы с окружающим воздухом, растворением этих нитрит-ионов в среде, а также реакциями других азотсодержащих молекул, например, диоксида азота и монооксида азота, с водой и АФК как в газовой, так и в жидкой фазе, и их растворением в среде [110]. Следующее за ростом снижение концентрации NO_2^- может быть связано с расходом нитрит-ионов в реакциях с АФКА, например, с пероксидом водорода с образованием пероксинитрита и далее – синглетного кислорода [219], а также с обратимым процессом нитрозирования остатков цистеина белков сыворотки (FBS), поверхностных белков клеток и аминокислот, входящих в состав среды [220,221]. Вторичный незначительный рост концентраций нитрит-ионов может быть связан с высвобождением нитрозильных групп из модифицированных белков, например, под действием внеклеточных тиоредоксинов (TRX) с последующим их окислением до нитрит-ионов [222]. Другим источником роста концентраций может являться образование вторичного синглетного кислорода при взаимодействии синтезированного ранее пероксинитрита с пероксидом водорода по механизму Рассела, при котором нитрит-ионы являются побочным продуктом [219].

Наблюдаемая разница в содержании NO_2^- после воздействия ХПС в среде здоровых и опухолевых клеток может частично объяснять различие в чувствительности клеток к ХПС. Полученные данные о накоплении NO_2^- в среде после воздействия ХПС согласуются с данными, полученными Х. Вакеро с соавторами [200] и Г. Бауэром [219].

3.2.2 Изменение баланса АФКА внутри клеток после обработки ХПС

Активные формы кислорода и азота из культуральной среды могут проникать внутрь клетки через аквапориновые каналы, если размеры АФКА не превышают 2.8 Å в диаметре [223], либо через повреждения в мембране, пока они не подверглись репарации. Доступным методом изучения изменения уровня внутриклеточных активных форм кислорода и азота является использование восстановленных производных флуоресцеина, например, диацетата 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина (H_2DCFDA). Эта молекула деацетилируется клеточными эстеразами и проникает в клетку, где окисляется АФКА до 2',7'-дихлорофлуоресцеина DCF^- , который флуоресцирует в области 533 нм при возбуждении светом с длиной волны 511 нм (Рисунок 5). Изначально эта молекула использовалась для детекции гидроксил-радикалов, однако более правильно говорить о ней как о сенсоре, отражающим суммарное содержание окислителей в среде или клетке, так как и другие АФКА вносят вклад в образование флуоресцирующей формы. Так, сопоставимую с

гидроксил-радикалом активность проявляет пероксинитрит, а концентрация органических пероксидных радикалов, необходимая для достижения такого же уровня флуоресценции, должна быть примерно в 10 раз выше [88].

Для оценки динамики изменения содержания внутриклеточных АФКА клетки культур А-549 и Wi-38 облучали ХПС, после чего к культивируемым клеткам добавляли H_2DCFDA и далее анализировали методом проточной цитометрии долю DCF⁺-положительных клеток (Рисунок 18).

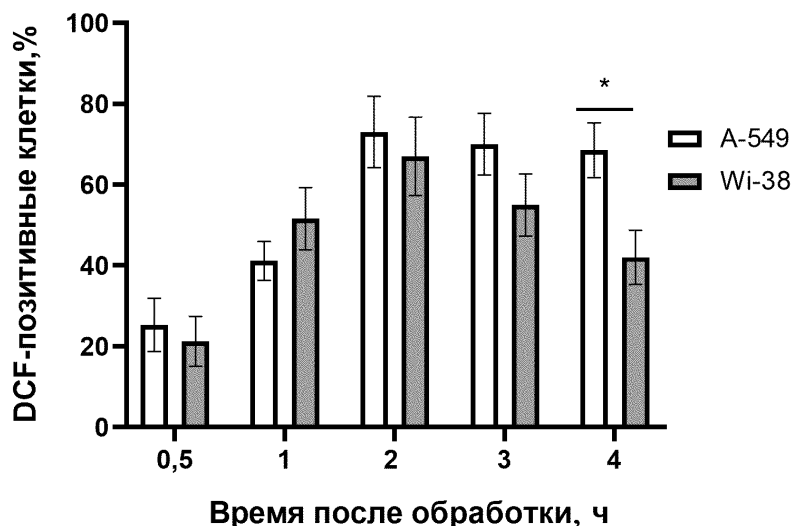


Рисунок 18 – Динамика относительного уровня активных форм кислорода и азота внутри клеток культур А-549 и Wi-38. Представлены данные проточной цитометрии клеток, инкубированных с H_2DCFDA . Результаты представлены как среднее значение разности долей положительных клеток в образце обработанных клеток и в образце необработанных клеток, рассчитанное по трем повторам $\pm$ стандартное отклонение. Статистическая значимость обозначена как $*p \leq 0.05$, тест Манна-Уитни.

Обработка ХПС приводит к увеличению доли клеток с высоким содержанием АФКА. Первоначальное увеличение (30 мин после обработки) доли таких клеток наиболее вероятно отражает проникновение первичных АФКА. Поскольку доза облучения ХПС для здоровых и опухолевых клеток была одинаковой, результат с одинаковым увеличением измеряемых АФКА в обеих культурах не противоречит гипотезе. Дальнейшее резкое увеличение (1-2 ч после обработки) содержания АФКА обусловлено, наиболее вероятно, эффектом вторичных АФКА, образуемых в клетке в условиях окислительного стресса, поскольку первичные АФКА относительно короткоживущие (п. 1.2). Более того, эти данные хорошо соотносятся с увеличением концентрации нитрит-ионов в культуральной среде через 2 ч после облучения относительно точки 30 мин после облучения. В

дальнейшем доля опухолевых клеток с высокой интенсивностью флуоресценции в период наблюдения остается примерно на одном уровне, а в образцах фибробластов легкого – снижается. Можно предположить, что в фибробластах легкого системы антиоксидантных ферментов остаются функциональными и способны нейтрализовать образуемые АФКА. В опухолевых клетках базовый уровень внутриклеточных АФКА выше и создается их избыток, который может приводить к повреждению биомолекул и гибели клеток. Анализ различий метаболизма клеток культур А-549 и Wi-38 будет приведен ниже.

3.2.3 Динамика перекисных повреждений липидов мембран клеток после обработки ХПС

Одним из важных типов биомолекул, подвергающихся повреждению АФКА, являются липиды, в частности, ненасыщенные жирные кислоты, экспонированные внутрь бислоя мембран клетки и ее органелл. Окисление ненасыщенных углерод-углеродных связей может происходить под действием, например, гидроксил-радикалов, генерируемых в реакции Фентона, и может приводить к дестабилизации мембран. Кроме того, продукты распада таких липидов, например, 4-гидроксиноненаль, малоновый диальдегид и акролеин способны модифицировать белки и активировать сигнальные пути, регулирующие активность систем антиоксидантных ферментов, процессы синтеза белков, гибели клеток [224].

Для исследования накопления пероксидов липидов клетки А-549 обрабатывали ХПС в течение 60 с и через 1, 3 и 6 часов окрашивали реагентом BODIPY™ 581/591 C11 и анализировали методом проточной цитометрии (Рисунок 19). Это соединение проникает в клетки и встраивается в мембраны. В восстановленной форме обладает флуоресценцией с максимум испускания при 590 нм, после окисления происходит сдвиг спектра, максимум испускания – 510 нм.

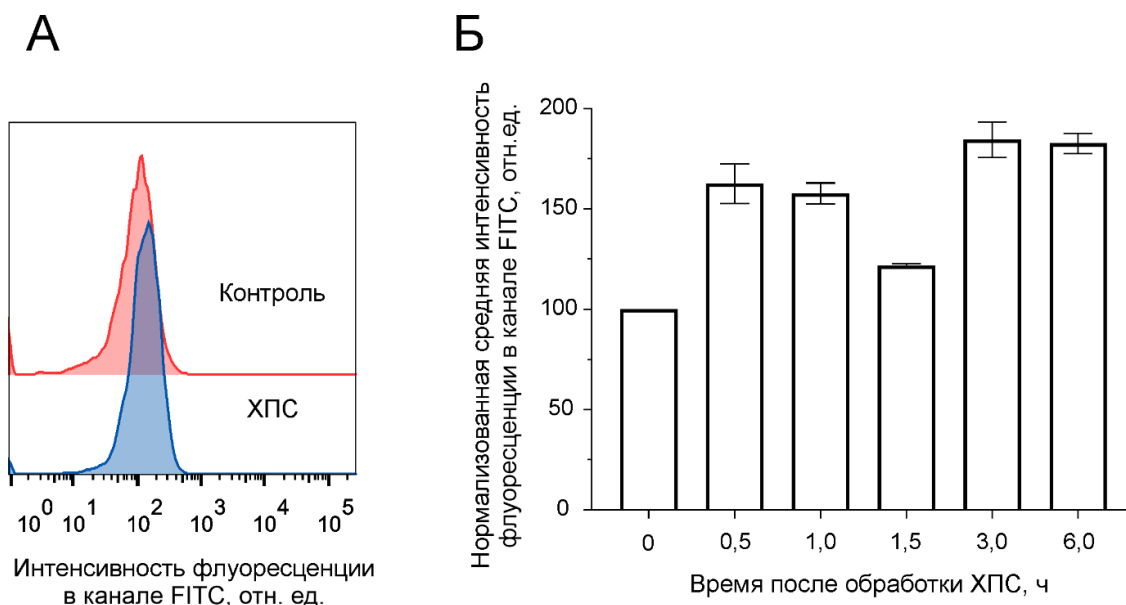


Рисунок 19 – Анализ динамики перекисного окисления липидов в клетках А-549 через 1,3, 6 часов после обработки ХПС. Представлены результаты проточной цитометрии образцов клеток, окрашенных реагентом BODIPY™ 581/591 C11. А – пример распределения клеток по интенсивности флуоресценции окисленной формы красителя, Б – количественный обсчет результатов анализа. Данные представлены как средние значение интенсивностей флуоресценции в канале FITC (окисленный краситель), нормализованные на значение контрольного образца (в точке 0ч), рассчитанные по двум повторам $\pm$ стандартное отклонение.

Из данных, приведенных на рисунке 19Б, можно видеть, что в клетках А-549 наблюдается двухэтапное увеличение доли окисленных липидов мембран. Можно предположить, что первоначальное повышение в течение 30 мин после обработки ХПС обусловлено окислением мембран первичными АФКА. Доля окисленных липидов снижается к 1,5 часам после обработки и далее наблюдается повторное увеличение этого показателя, которое может быть обусловлено окислением липидов под действием вторичных АФКА. Снижение доли к 1,5 ч может быть обусловлено активацией систем, устраняющих перекисные повреждения липидов. В этом процессе участвуют системы, удаляющие участки мембран в случае образования в них пор, например, эндосомный сортировочный комплекс III, необходимый для транспорта (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) [225,226]. Процесс перекисного окисления может прерываться за счет нейтрализации пероксидов жирных кислот низкомолекулярными антиоксидантами, такими как глутатион и кофермент Q₁₀ под действием глутатионпероксидазы 4 (GPX4) и белка-супрессора ферроптоза 1 (FSP1) соответственно

[65]. Окисленные жирные кислоты удаляются ферментами, обладающими фосфолипазной активностью, например, фосфолипазой A2, а также пероксиредоксином 6 [227].

3.3 Изменения в транскриптоме клеток после обработки ХПС

Первичные и вторичные АФКА, модифицированные ими биомолекулы, а также продукты окислительно-восстановительных реакций в клетках могут активировать различные сигнальные пути, прохождение которых, в конечном итоге, заканчивается либо выживанием клетки и делением, выживанием клетки без возможности войти в репликативный цикл, либо ее гибелью.

Для изучения активации и подавления сигнальных путей полезным инструментом является анализ транскриптома клеток после воздействия стимула. Этот метод позволяет оценить изменение экспрессии генов и групп генов, выявить регуляторы этих изменений, определить кластеры коэкспрессирующихся генов, а также определить биологические процессы, вовлеченные в ответ клеток на изучаемый стимул.

Клетки аденокарциномы легкого культуры A-549 и фибробласты легкого культуры Wi-38 обрабатывали ХПС в стандартных условиях в течение 60 или 120 с, что соответствует низкой и высокой дозам облучения. Для анализа изменения генов раннего и позднего ответа проводили лизис обработанных клеток через 3 ч или 24 ч после обработки, выделяли суммарную РНК для последующего секвенирования транскриптома на платформе Illumina. Далее по тексту для экспериментальных образцов будут использованы обозначения формата «первая буква обозначения культуры клеток_время после обработки/продолжительность обработки», например, обозначение «A_3ч/120с» соответствует образцу клеток культуры A-549, обработанных ХПС в течение 120с с лизисом через 3 ч после обработки (Таблица 5).

Таблица 5 – Условные обозначения экспериментальных образцов

Культура клеток	Время после обработки ХПС, ч	Продолжительность обработки, с	Код образца
А-549	3	0	А_3ч/контр
		60	А_3ч/60с
		120	А_3ч/120с
	24	0	А_24ч/контр
		60	А_24ч/60с
Wi -38	3	0	W_3ч/контр
		60	W_3ч/60с
		120	W_3ч/120с
	24	0	W_24ч/контр
		60	W_24ч/60с

Обработку данных проводили двумя независимыми способами, схематично изображенными на рисунке 20.

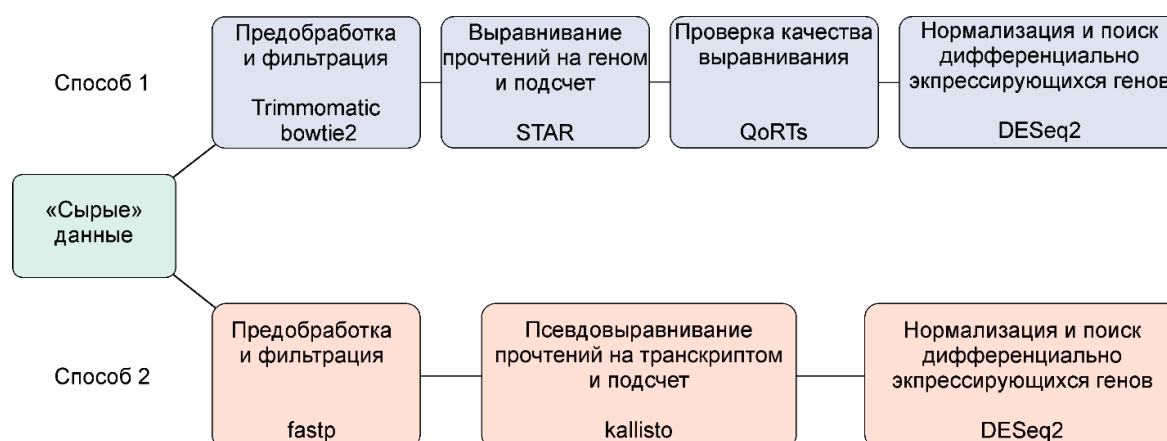


Рисунок 20 – Последовательность обработки данных секвенирования транскриптома клеток, обработанных ХПС.

Первый подход включает в себя картирование прочтений на референсный геном человека при помощи алгоритма STAR с последующим подсчетом картированных на конкретный ген прочтений алгоритмом QoRTs. Картирование на геном и анализ дифференциальной экспрессии генов по данным, полученным с использованием этого подхода, были выполнены с.н.с. ЛБТ ИХБФМ СО РАН Семеновым Д.В. Функциональный

анализ выявленных дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) выполнен Семеновым Д.В. и автором работы совместно.

Второй подход отличается от первого использованием алгоритма сверхбыстрого псевдокартирования прочтений на транскриптом человека с одновременным подсчетом прочтений при помощи алгоритма kallisto. Поиск дифференциально экспрессирующихся генов, их функциональный анализ выполнены автором работы самостоятельно.

Инструменты для псевдокартирования прочтений на референсный транскриптом находят в последние годы широкое применение благодаря минимальным требованиям к вычислительным ресурсам и скорости работы. При анализе наборов данных, полученных на организмах с хорошо аннотированным транскриптомом, алгоритм kallisto демонстрирует, как правило, меньшую точность выравнивания прочтений и меньшее количество выявленных ДЭГ, однако на уровне функционального анализа генов результаты, полученные при помощи kallisto и STAR, оказываются сопоставимыми [228–231]. Далее по тексту приводятся данные, полученные путем псевдокартирования прочтений при помощи kallisto (способ 2), функциональный анализ наборов генов проводился с использованием данных, полученных при помощи STAR, как более точного подхода (способ 1).

3.3.1 Предобработка «сырых» данных, оценка качества прочтений, фильтрация, нормализация и кластерный анализ образцов транскриптомов

В результате секвенирования было получено более 21 млн прочтений для каждого экспериментального условия (Таблица Б.2). После оценки качества прочтений была проведена фильтрация для удаления прочтений низкого качества, которые могли бы исказить результаты анализа. Из таблицы Б.3 видно высокое качество полученных прочтений: более 97% прочтений во всех образцах прошли фильтрацию.

Было проведено псевдовыравнивание прочтений на транскриптом человека (версия GRCh38) при помощи алгоритма kallisto. Данный алгоритм производит также и подсчет картированных прочтений, выходными данными является таблица с количеством транскриптов. Для большинства образцов на транскриптом было картировано более 85% прочтений (Таблица Б.4). Количественные данные о картированных прочтениях были импортированы в RStudio для дальнейшего анализа.

Из данных, представленных на рисунке Б.1А видно, что исходные данные содержат большое количество низкоэкспрессирующихся генов: медиана экспрессии находится около $2^0 = 1$. Рассмотрение таких генов в рамках транскриптомного анализа нецелесообразно, так

как возможно получение ложноположительных результатов. При фильтрации из набора данных были удалены гены, содержащие нулевое значение экспрессии хотя бы в одном из образцов (Рисунок Б.1Б).

Полезным этапом анализа данных полнотранскриптомного секвенирования является кластерный анализ, позволяющий определить различие и подобие индивидуальных образцов. Использовали 2 метода: иерархическую кластеризацию (Рисунок 21А) и анализ главных компонент (Рисунок 21Б).

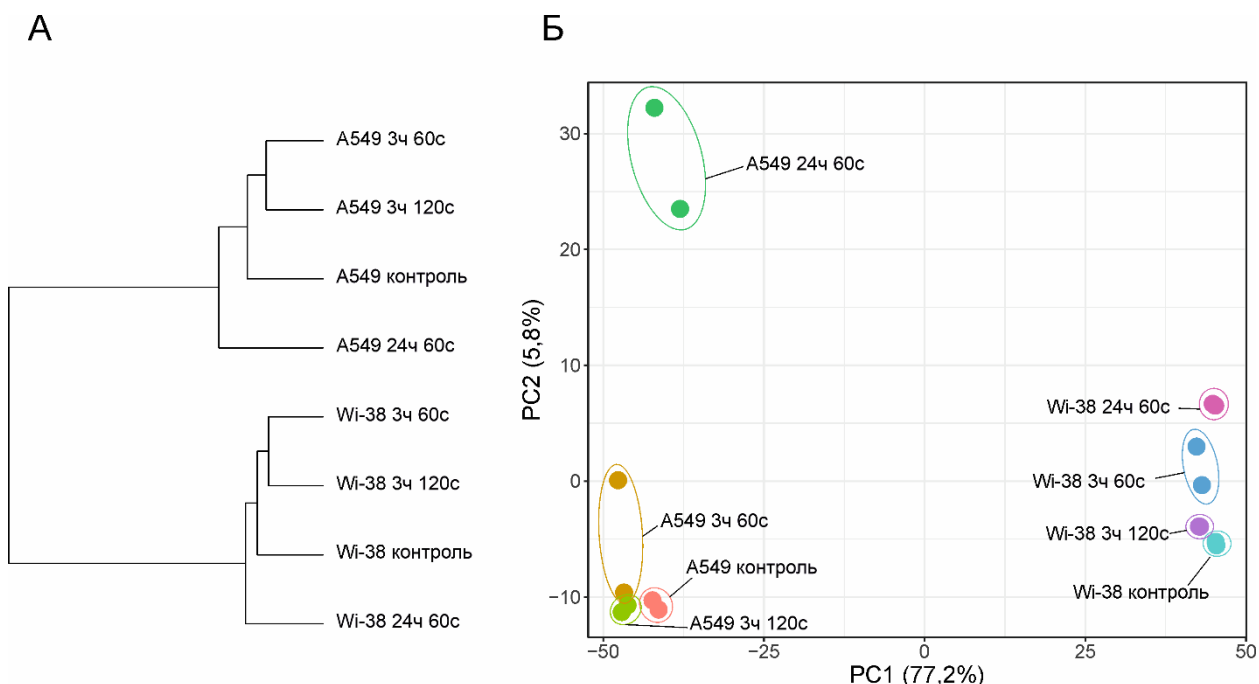


Рисунок 21 – Кластерный анализ образцов транскриптомов обработанных ХПС клеток. А – иерархическая кластеризация методом наиболее удаленных соседей (полной связи, complete-linkage), Б – анализ главных компонент.

Можно видеть, что клеточные линии формируют отдельные кластеры, причем обработка ХПС не влияет на характер кластеризации. Более ранние экспериментальные точки – 3ч/60с и 3ч/120с – кластеризуются ближе к необработанным образцам, а образцы 24ч/60с расположены вдали от остальных точек, т.е. в этих образцах наблюдаются наибольшие транскрипционные изменения. Причем образцы клеток, получивших большую дозу облучения – 2 мин, ближе к контрольным образцам, чем получивших меньшую дозу – 1 мин. Интересно, что обработка ХПС вызывает однонаправленные изменения для клеток обеих культур, однако амплитуда изменений более выражена для опухолевых клеток А-549, чем для здоровых фибробластов Wi-38 (Рисунок 21Б).

Далее проводили поиск дифференциально экспрессирующихся генов в образцах клеток. Дифференциально экспрессирующимися генами (ДЭГ) далее будут называться все гены, экспрессия которых на уровне мРНК статистически достоверно изменяется при воздействии ХПС относительно необработанных контрольных клеток или между клеточными линиями в базовом состоянии. Выявление ДЭГ – статистическое сравнение количества прочтений с мРНК конкретного гена между образцами, результатом которой является кратность изменения экспрессии этого гена, выраженная в логарифмическом виде (логарифм по основанию 2), и обозначаемая как $\log_2FC$ (FC – от английского Fold Change).

3.3.2 Отличия в транскриптомах клеточных линий A-549 и здоровых фибробластов легкого Wi-38, определяющие метаболическую активность клеток и чувствительность к окислительному стрессу

Для анализа ответа облученных клеток на обработку ХПС важно понимать отличия между выбранными опухолевыми и здоровыми клетками на базовом уровне. Интерес в рамках данной работы представляют различия метаболизма клеток, в том числе различия в экспрессии генов, продукты которых участвуют в нейтрализации АФКА, так как эти процессы определяют баланс АФКА в клетке и, следовательно, предрасположенность к окислительному стрессу. Был проведен поиск дифференциально экспрессирующихся ($|\log_2FC| > 1$) генов в образцах опухолевых клеток легкого человека культуры A-549 и здоровых фибробластов легкого Wi-38. Использовали контрольные, необработанные ХПС, образцы клеток. Выявленные ДЭГ были соотнесены со списками генов участников основных метаболических путей из базы данных KEGG. Представленность транскриптов тех или иных генов не позволяет получить полной информации о процессах метаболизма клетки, однако может дать общее представление о релевантности используемой модели. Список метаболических путей с идентификаторами представлен в таблице Б.5.

Среди генов гликолиза, экспрессия которых увеличена в опухолевых клетках (Таблица 6), присутствуют ген фермента, содержащего домен гексокиназы 1 (Hexokinase Domain Containing 1, *HKDC1*), повышенная экспрессия которого характерна для опухолей легкого и ассоциирована с плохим прогнозом [232], гены альдегид-дегидрогеназ, участвующих в анаэробных превращениях пирувата, а также в других метаболических процессах, например, в утилизации продуктов перекисного окисления липидов и в окислении альдегидов с длинной цепью до жирных кислот.

Таблица 6 – изменение экспрессии генов, ассоциированных с гликолизом, в клетках А-549 относительно клеток Wi-38

Ген	log ₂ FoldChange	P _{adj}
<i>HKDC1</i>	4,59	7,13×10 ⁻¹³¹
<i>ALDH3A2</i>	2,79	8,00×10 ⁻⁶³
<i>ALDH2</i>	2,28	4,33×10 ⁻³⁰
<i>ALDH3B1</i>	1,96	6,47×10 ⁻²¹
<i>PFKP</i>	1,55	1,31×10 ⁻³⁷
<i>PKM</i>	1,11	5,46×10 ⁻⁵¹
<i>ENO3</i>	1,10	2,61×10 ⁻⁰⁴
<i>ALDH1B1</i>	1,08	1,39×10 ⁻²¹
<i>GPI</i>	1,06	6,10×10 ⁻²¹
<i>G6PC3</i>	1,06	3,77×10 ⁻⁰⁵
<i>PGM1</i>	-1,11	3,67×10 ⁻²³
<i>PGM2</i>	-1,37	5,74×10 ⁻¹⁷
<i>PFKL</i>	-1,70	7,56×10 ⁻⁴⁶
<i>HK1</i>	-1,99	2,15×10 ⁻¹⁴

Кроме того, в клетках А-549 повышена экспрессия генов фосфофруктокиназы Р PFKP, пируват-киназы М1/2 PKM, енолазы 3 ENO3, каталитической субъединицы 3 глюкозо-6-фосфатазы G6PC3. Экспрессия генов гексокиназы HK1, фосфофруктокиназы L PFKL, фосфоглюкомутаза PGM 1 и 2, наоборот, снижена относительно здоровых клеток. Таким образом, в клетках аденокарциномы легкого наблюдается активация экспрессии генов ферментов, катализирующих необратимые стадии гликолиза, а также ферментов, участвующих в анаэробных превращениях пирувата.

Другим важным путем катаболизма глюкозы является пентозофосфатный путь. Данные по изменению экспрессии генов, участвующих в этом процессе, показаны в таблице 7.

Таблица 7 – изменение экспрессии генов, участвующих в пентозофосфатном пути, в клетках А-549 относительно клеток Wi-38 (не показаны данные по экспрессии генов, ассоциированных с гликолизом, из таблицы 6)

Ген	log ₂ FoldChange	P _{adj}
<i>G6PD</i>	3,89	4,61×10 ⁻⁹⁸
<i>PGD</i>	3,21	3,43×10 ⁻²²⁵
<i>TKT</i>	1,96	2,26×10 ⁻⁵⁴
<i>TALDO1</i>	1,96	7,58×10 ⁻³⁹

Наблюдается значительное увеличение экспрессии генов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, транскетолазы и трансальдолазы 1.

Интересно, что среди ферментов цикла трикарбоновых кислот наблюдается изменение экспрессии только для генов цитрат синтазы *ACLY* ($\log_2FC = 1,49$, $p_{adj} = 6,87 \times 10^{-45}$) и некаталитической субъединицы бета изоцитрат-дегидрогеназы (NAD⁺) *IDH3B* ($\log_2FC = 1,04$, $p_{adj} = 1,65 \times 10^{-15}$).

Одним из часто dereguliruyemykh в опухолевых клетках метаболических путей является окислительное фосфорилирование. Результатом изменения экспрессии генов цепи переноса электронов может быть увеличение концентраций активных форм кислорода за счет более интенсивной «утечки» электронов, что способствует, с одной стороны, более активной пролиферации таких клеток, а с другой стороны – накоплению окислительных повреждений биомолекул [182]. В таблице 8 представлены данные по изменению экспрессии генов, продукты которых участвуют в окислительном фосфорилировании.

Таблица 8 – Изменение экспрессии генов, ассоциированных с окислительным фосфорилированием, в клетках A-549 относительно клеток Wi-38

Ген	$\log_2\text{FoldChange}$	p_{adj}
<i>COX17</i>	1,67	$1,55 \times 10^{-12}$
<i>UQCRFS1</i>	1,61	$2,12 \times 10^{-45}$
<i>COX15</i>	1,58	$6,45 \times 10^{-17}$
<i>CYCS</i>	1,54	$3,01 \times 10^{-36}$
<i>CYC1</i>	1,34	$2,36 \times 10^{-26}$
<i>COX4I1</i>	1,14	$1,48 \times 10^{-09}$
<i>NDUFS3</i>	1,08	$2,15 \times 10^{-12}$

Видно, что в опухолевых клетках наблюдается повышенная экспрессия генов белков, входящих в состав комплексов цепи переноса электронов. Например, белки *COX17*, *COX15* и *COX4I1* участвуют в формировании комплекса IV, *UQCRFS1* и *CYC1* – комплекса III, *NDUFS3* – комплекса I, *CYCS* – ген цитохрома C, переносящего электроны между комплексами III и IV. Повышенная экспрессия перечисленных генов может свидетельствовать о более активной работе цепи переноса электронов в клетках культуры A-549 по сравнению с фибробластами Wi-38. Полученные результаты согласуются с литературными данными, так, в клетках некоторых опухолей наблюдается повышенная экспрессия генов *UQCRFS1* [233], *NDUFS3* [234], *COX17* [235], *COX15* [236].

Важную роль в обеспечении клетки энергией играет метаболизм жирных кислот. Изменение экспрессии генов, участвующих в деградации и синтезе жирных кислот (ЖК), в опухолевых клетках представлено в таблице 9. При этом не показаны гены, ассоциированные с гликолизом.

Таблица 9 – Изменение экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом жирных кислот, в клетках A-549 относительно клеток Wi-38

Ген	log ₂ FoldChange	P _{adj}
Катаболизм жирных кислот		
<i>CPT1A</i>	1,62	1,00×10 ⁻³⁸
<i>CPT1B</i>	-1,21	4,00×10 ⁻⁰⁵
Биосинтез жирных кислот		
<i>ACACB</i>	1,96	1,65×10 ⁻⁰⁷
<i>CBR4</i>	1,40	4,19×10 ⁻⁰³
<i>FASN</i>	1,30	1,11×10 ⁻¹⁵

Скорость-лимитирующей стадией процесса окисления жирных кислот является их транспорт в митохондрию, который протекает путем присоединения молекулы ЖК к карнитину с последующим переносом внутрь митохондрии карнитин-ацилкарнитин транслоказой. Из таблицы 9 видно, что в опухолевых клетках культуры A-549 увеличивается экспрессия карнитин-пальмитоилтрансферазы 1A (*CPT1A*) и снижение экспрессии карнитин-пальмитоилтрансферазы 1B (*CPT1B*) по сравнению со фибробластами легкого. Стоит отметить, что экспрессия изоформы *CPT1B* не характерна для клеток легкого и ее базовый уровень в клетках обеих линий находится на низком уровне. Повышенная экспрессия *CPT1A* описана для клеток некоторых опухолей [237,238].

В клетках культуры A-549 по сравнению с фибробластами Wi-38 наблюдается также увеличение экспрессии ацетил-КоА карбоксилазы *ACACB*, катализирующей скорость-лимитирующую стадию биосинтеза ЖК – карбоксилирование ацетил-КоА. Кроме того, в опухолевых клетках повышена экспрессия карбонил редуктазы 4 (*CBR4*) и 3-гидроксиацил-АСР-дегидратазы (*FASN*). Белки, кодируемые этими генами, являются компонентами ферментной системы синтазы ЖК.

Пути метаболизма аминокислот разнообразны и зависят от типа бокового радикала, поэтому списки генов, которые участвуют в регуляции метаболизма аминокислот, были сведены в единую таблицу с удалением повторяющихся элементов (Таблица Б.6). Можно видеть, что наибольшее увеличение экспрессии наблюдается для гена кинурениназы *KYNU*. Этот фермент участвует в катаболизме триптофана и является маркером плохого прогноза

при аденокарциноме легкого. Интересно, что его экспрессия может активироваться под действием транскрипционного фактора NRF2 (NFE2L2), отвечающего за активацию транскрипции генов антиоксидантных ферментов [239,240]. Кроме того, в клетках культуры A-549 значительно увеличена экспрессия гена глутамин-фруктозо-6-фосфат трансминазы 2 (*GFPT2*), катализирующей скорость-лимитирующую стадию биосинтеза N-ацетил-УДФ-глюкозы, использующейся клеткой для гликозилирования белков. В здоровых клетках наблюдается низкая экспрессия этого гена, однако в опухолевых клетках с мутациями в гене *EGFR* происходит активация транскрипции этого гена и «гипергликозилирование» белков [препринт, 208]. Наблюдается также характерное для опухолей легкого [242,243] увеличение экспрессии генов N-ацетиласпартат синтетазы NAT8L и ферментов, участвующих в метаболизме полиаминов в клетке: спермин оксидазы SMOX и спермидин/спермин N1-ацетилтрансферазы 1 (SAT1). Увеличивается также экспрессия генов ряда альдегиддегидрогеназ, белка RIMKB (гиперэкспрессирован в опухолевых тканях легкого [244]), субъединиц глутамат-цистеин лигазы – фермента, катализирующего скорость-лимитирующую стадию синтеза глутатиона, – GCLC и GCLM.

Наибольшее снижение экспрессии наблюдается для гена альдегид оксидазы 1 AOX1 – фермента семейства ксантин оксидаз, участвующего в метаболизме ксенобиотиков. Подавление экспрессии этого гена наблюдается в некоторых типах опухолей [245,246]. Отмечается, что нокдаун этого гена в нормальных клетках приводит к активации пути катаболизма триптофана, что приводит к повышению концентраций NADP⁺ и увеличению оборотов пентозофосфатного пути и синтеза нуклеотидов. Сниженная по сравнению со здоровыми фибробластами экспрессия наблюдается также для гена субъединицы альфа 1 пролил-4-гидроксилазы P4HA1, катализирующей образование 4-гидроксипролина, необходимого для правильного формирования третичной структуры коллагена. Интересно, что в литературе отмечается повышенная экспрессия этого гена в тканях опухолей легких [247,248]. Похожие данные получены по компонентам пути катаболизма аминокислот с разветвленным боковым радикалом: экспрессия генов *BCAT1* и *BCKDHB* снижена в опухолевых клетках, хотя считается, что их интенсивный катаболизм связан с ускоренной пролиферацией опухолевых клеток легкого [249,250]. Однако клинические данные показывают, что эти гены не могут использоваться как прогностические маркеры при опухолях легкого [251,252].

Гены, вовлеченные в регуляцию метаболизма пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов представлены в таблице Б.7. Стоит отметить, что более интенсивный по сравнению с нетрансформированными клетками синтез мономеров нуклеиновых кислот характерен для активно пролиферирующих клеток, поэтому среди представленных генов

есть как гены ферментов *de novo* синтеза нуклеотидов, так и ферментов, катализирующих стадии синтеза из разрушенных нуклеиновых кислот и отдельных азотистых оснований. Наибольшему увеличению в опухолевых клетках подвергается экспрессия гена фосфодиэстеразы 4D (*PDE4D*), катализирующей гидролиз 3',5'-циклических АМФ и ГМФ. Показано, что активность этого фермента имеет значение для пролиферации и метастазирования опухолевых клеток, а гиперэкспрессия этого гена характерна для линий опухолевых клеток легкого с мутантным геном *SKT11*, к числу которых относится и линия А-549 [253]. Кроме того, экспрессия генов других фосфодиэстераз: *PDE7B*, *PDE4B*, *PDE8A*, увеличена в клетках аденокарциномы легкого относительно фибробластов легкого, экспрессия гена фосфодиэстеразы 6D (*PDE6B*), наоборот, понижена. Гены эктонуклеотидаз *ENTPD1*, *ENTPD6*, *NT5C*, *NT5E*, *NTPCR*, *NT5C2*, а также ген аденозиндезаминазы *ADA* и аденин-фосфорибозилтрансферазы *APRT* относятся к важным регуляторам метаболизма АТФ и аденозина. Известно, что повышенная активность эктонуклеотидаз приводит к иммуносупрессии в микроокружении многих типов опухолей, нарушая передачу сигналов иммунным клеткам [254].

Учитывая наблюдаемые отличия в метаболических путях, вовлеченных в генерацию АФКА, интересно было исследовать отличия в экспрессии генов антиоксидантных ферментов в клетках этих культур. Из данных таблицы Б.8 можно видеть, что в опухолевых клетках культуры А-549 по сравнению с фибробластами легкого Wi-38 наблюдается повышенная экспрессия генов, участвующих в метаболизме цистеина, цистина и глутатиона (*GGT1*, *GPX3*, *GSR*, *MGST1*, *GCLC*, *SLC3A2*, *SLC7A11* и др.), железа (*CP*, *FTL*, *FTH1*), а также генов ферментов антиоксидантных белков (*TXNRD1*, *NQO1*, *HMOX1*, *GPX3*).

Из приведенных выше данных можно заключить, что в исследуемых опухолевых клетках присутствуют значительные изменения в характере экспрессии генов, участвующих в регуляции метаболизма. Наблюдаются характерные для опухолевых клеток метаболические особенности: повышение экспрессии генов, участвующих в транспорте глюкозы в клетку, в метаболизме глюкозы в гликолизе и пентозофосфатном пути, дерегуляция генов компонентов ЦПЭ, активный метаболизм аминокислот, жирных кислот и нуклеотидов [169]. Кроме того, в ходе проведенного анализа показано, что в рассматриваемых опухолевых клетках культуры А-549 наблюдается гиперэкспрессия ряда генов, являющихся важными маркерами немелкоклеточного рака легкого и, в частности, аденокарциномы легкого. Можно сделать вывод, что выбранная пара линий: клетки аденокарциномы легкого человека культуры А-549 и фибробласты легкого человека

культуры Wi-38, может быть использована для сравнения эффектов холодной плазмы и других противоопухолевых средств на опухолевые и здоровые клетки одного гистологического происхождения *in vitro*.

Важная особенность опухолевых клеток – повышенная экспрессия генов ферментов, обеспечивающих защиту клетки от окислительного стресса. Такие изменения позволяют клеткам поддерживать уровень АФКА, необходимый для пролиферации, но недостаточный для критического повреждения биомолекул и гибели клетки [255]. Можно предположить, что ХПС в данном случае служит дополнительным источником АФКА, повышение концентраций которых опухолевые клетки неспособны компенсировать пропорциональным увеличением экспрессии нейтрализующих ферментов, что приводит к инициации их гибели.

Ограничением проведенного анализа является не только невозможность прямого переноса выявленных транскрипционных изменений на уровень белков и активности ферментов, но также и различия фибробластов и эпителиальных клеток, определяемые происхождением этих клеток и их функциями в организме. Однако, следует отметить, что фибробласты, растущие в культуре, не вполне отражают свойства фибробластов в организме, так как являются активно пролиферирующими и делящимися клетками, что находит отражение в метаболических потребностях этих клеток [256]. Можно предположить, что, учитывая эти особенности, описанные отличия метаболизма между культурами клеток обусловлены, в основном, онкотрансформированным характером клеток культуры А-549.

3.3.3 Дифференциально экспрессирующиеся гены в образцах клеток после обработки ХПС

В случае анализа образцов клеток после обработки ХПС дифференциально экспрессирующимися считали гены, изменение экспрессии которых составляло более 1,41 раз ($|\log_2FC| > 0,5$), а скорректированное значение *p.value* – менее 0,05. Количество генов, удовлетворяющих указанным условиям, представлено в таблице Б.9. Диаграммы Венна на рисунке 22 показывают количество общих и различающихся генов в наборах ДЭГ.

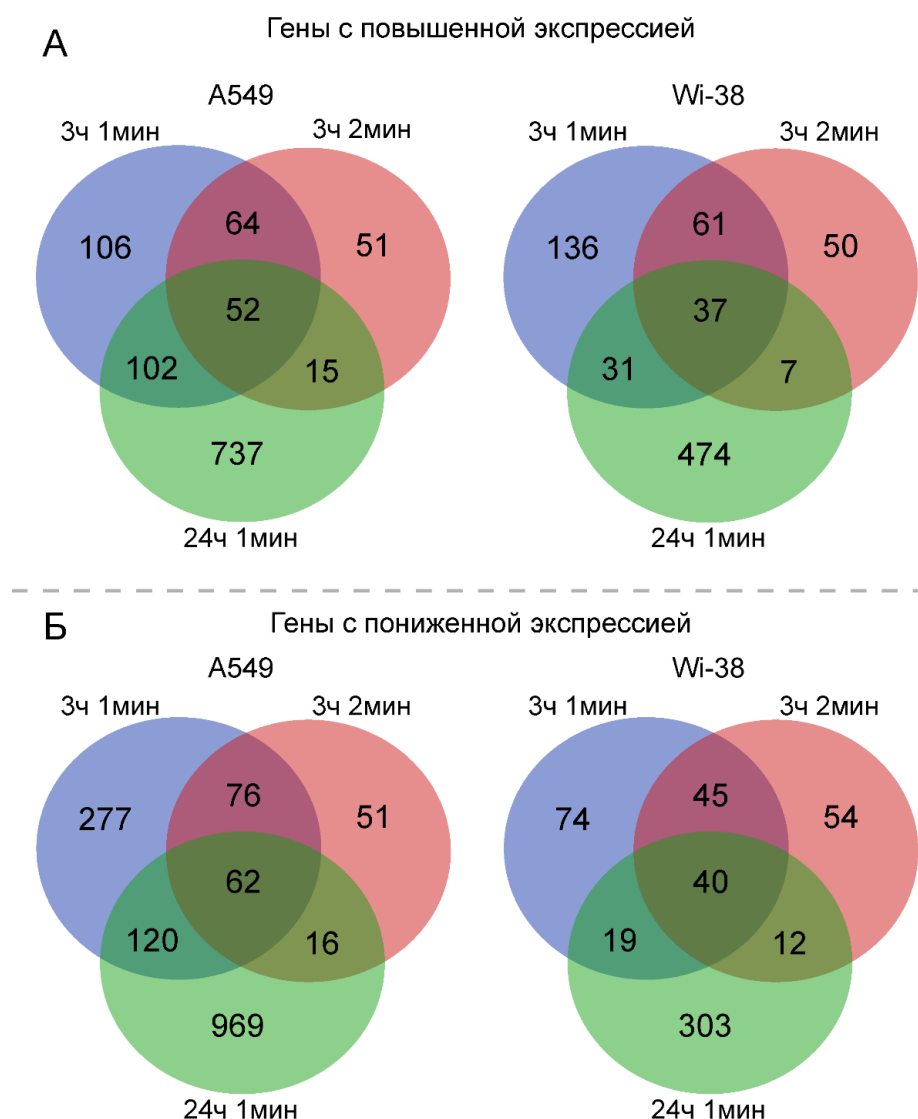


Рисунок 22 – Диаграммы Венна, показывающие количество общих и различающихся дифференциально экспрессирующихся ($|\log_2FC| > 0,5$, скорректированное значение $p.value < 0,05$) генов в наборах данных. А – результаты по генам с повышенной экспрессией, Б – по генам с пониженной экспрессией.

Стоит отметить относительно малое количество ДЭГ в наборах «3ч/120с» для обеих культур. Наибольшее количество ДЭГ наблюдается в наборах «24ч/60с», причем в образцах опухолевых клеток число генов значительно превосходит таковое в образцах нетрансформированных клеток. Диаграммы Венна для попарных сравнений культур в одинаковых условиях (Рисунок Б.2) показывают наличие большого количества уникальных генов в каждом наборе ДЭГ.

3.3.4.1 Выявление ключевых транскрипционных факторов и сигнальных путей, участвующих в ответе опухолевых клеток на обработку ХПС в течение 1 минуты

На первом этапе анализировали ДЭГ, выявленные в образцах клеток, обработанных ХПС в течение 1 мин, через 3 и 24 ч после обработки. Для каждого набора генов использовали по 250 генов с наибольшим изменением экспрессии либо в сторону увеличения, либо в сторону уменьшения экспрессии. Одинаковый количественный порог для всех образцов был использован с целью получить наиболее достоверные результаты обогащения терминов при функциональном анализе. Пороговые значения изменения экспрессии генов представлены в таблице Б.10.

В ходе анализа было выявлено, что несмотря на наличие уникальных генов в наборах ДЭГ (Рисунок 17), на уровне процессов сходство между временными точками очень велико. Кроме того, при анализе наборов генов с пониженной относительно контроля экспрессией в образцах через 3 ч после обработки ХПС зачастую не удавалось получить достоверного обогащения каких-либо терминов. По этим причинам, а также с целью упрощения представления данные функционального анализа по двум временным точкам (3 и 24 часа) были объединены.

Результаты анализа представлены в виде схем, обобщающих предсказанные транскрипционные факторы, участвующие в регуляции транскрипции, процессы, активируемые или подавляемые в клетках, а также гены, соединяющие эти узлы схем. Для культуры опухолевых клеток А-549 результаты анализа ДЭГ с повышенной относительно контроля экспрессией представлены на рисунке 24.

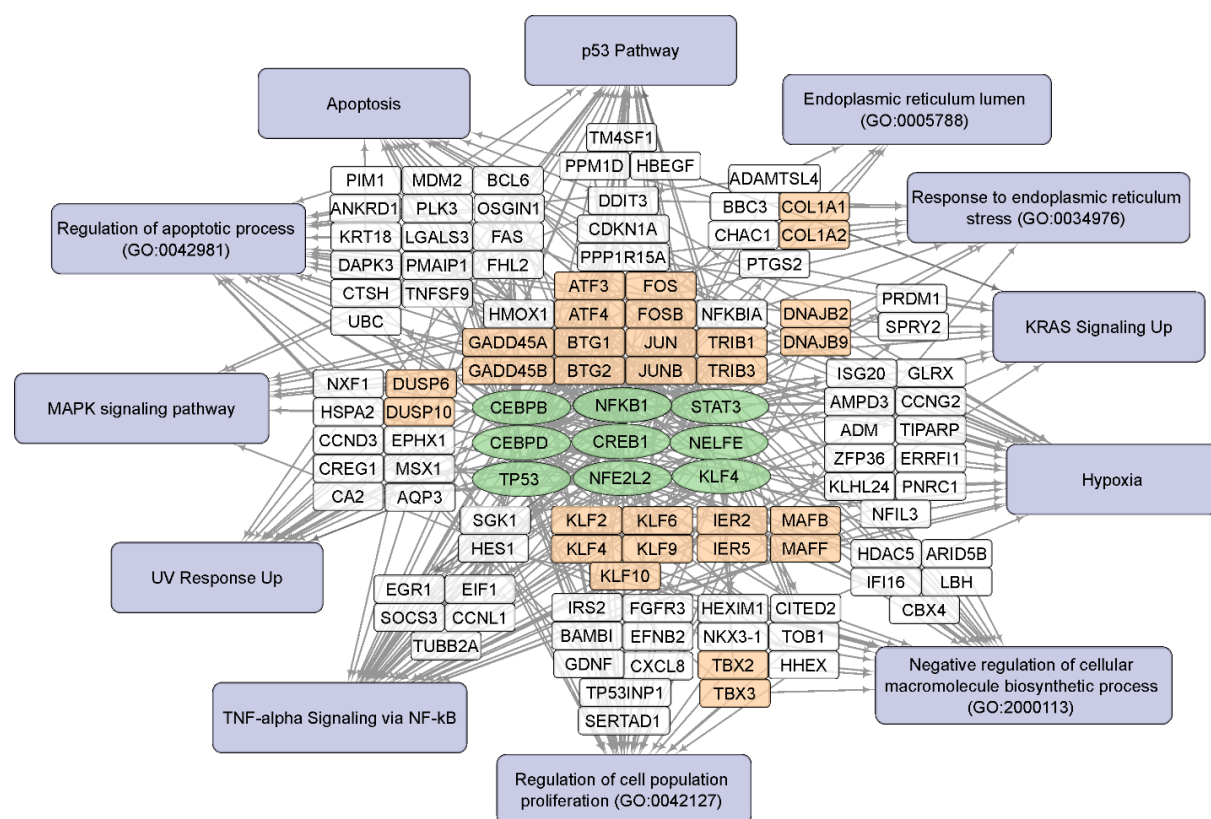


Рисунок 24 – Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) с повышенной относительно необработанного контроля экспрессией, выявленных в образцах опухолевых клеток А-549 после обработки ХПС в течение 1 мин. Активируемые транскрипционные факторы обозначены зеленым цветом, активируемые биологические процессы, сигнальные процессы, а также компоненты клетки, участвующие в этих процессах, обозначены фиолетовым цветом, ДЭГ – белым цветом, ДЭГ, принадлежащие в одному семейству генов, – оранжевым цветом.

Можно видеть, что гены с повышенной экспрессией участвуют в сигнальных путях p53, MAPK, KRAS, NF-kB, регулируя апоптоз, пролиферацию клеток, биосинтетические процессы, а также ответ на гипоксию и стресс эндоплазматического ретикулума. Обработка ХПС приводит к активации ряда транскрипционных факторов, включая TP53, NFE2L2, NFKB1, STAT3, KLF4, CREB1, NELFE и группу транскрипционных факторов CEBP. При этом можно выявить группы генов со схожей функцией или участвующих в одном процессе (обозначены на схеме оранжевым цветом). Так, например, белки FOS, FOSB, JUN, JUNB участвуют в работе транскрипционного комплекса AP-1. Белки ATF3, ATF4 регулируют ответ клеток на стресс ЭПР, вызванный накоплением неправильно свернутых белков. Экспрессия *GADD45A* и *GADD45B* активируется в ответ на повреждение ДНК [257].

Стоит отметить, что в пользу активации транскрипционного фактора NFE2L2 (Nrf2) свидетельствует изменение экспрессии генов, не указанных на схеме, т.к. изменение их

экспрессии ниже, чем у 250 генов, использованных для анализа. Так, ранним ответом на обработку ХПС является увеличение экспрессии генов метаболизма глутатиона, пероксиредоксина 1, сульфиредоксина 1, тиоредоксина и других, указанных в таблице Б.11. Кроме того, как было указано в обзоре литературы, спектр регулируемых генов для этого фактора может быть значительно расширен при взаимодействии его с другими транскрипционными факторами, в том числе факторами семейства AP-1.

Гены с пониженной относительно контроля экспрессией в опухолевых клетках участвуют в регуляции клеточного цикла и митотическом делении клетки. (Рисунок 25).

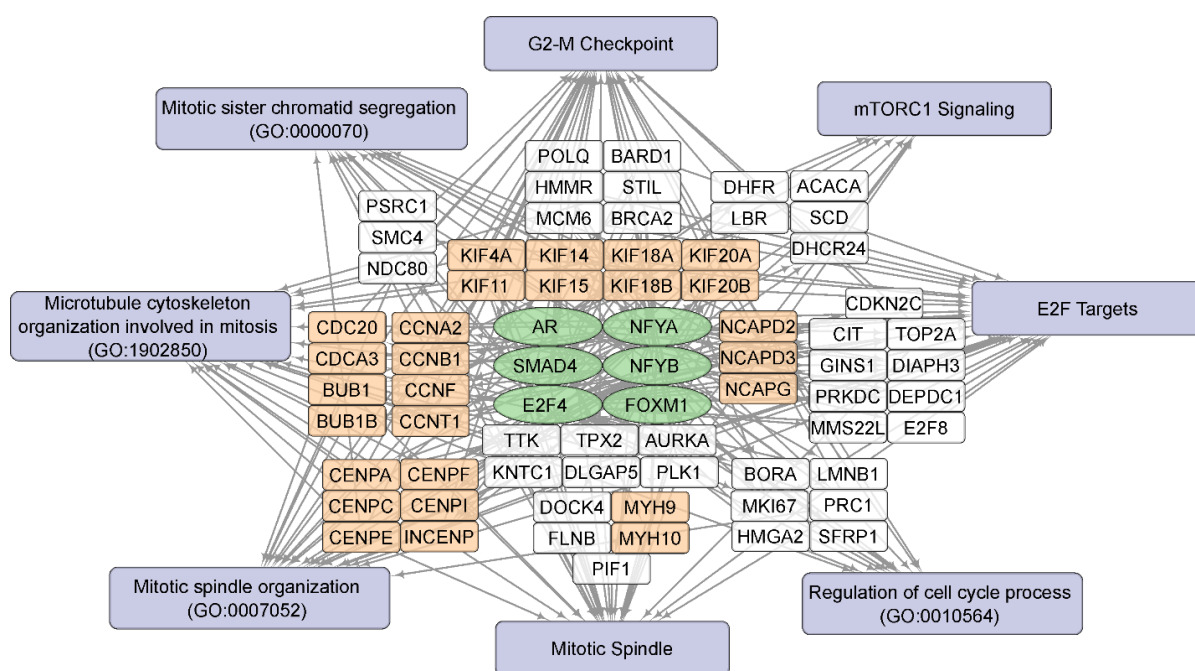


Рисунок 25 – Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) с пониженной относительно необработанного контроля экспрессией, выявленных в образцах опухолевых клеток А-549 после обработки ХПС в течение 1 мин. Транскрипционные факторы, активность которых подавляется, обозначены зеленым цветом, подавляемые биологические процессы, сигнальные процессы, а также компоненты клетки, участвующие в этих процессах, обозначены фиолетовым цветом, ДЭГ – белым цветом, ДЭГ, принадлежащие в одному семейству генов, – оранжевым цветом.

Можно видеть крупные кластеры генов кинезинов (KIF4A, KIF14 и т.д.), конденсинов (NCAPD2, NCAPD3, NCAPG), центромерных белков (CENPA, CENPC и т.д.), а также циклинов A2, B1, F и T1, участвующие в организации веретена деления, организацию цитоскелета и расхождение сестринских хроматид во время митоза. Кроме того, гены с пониженной экспрессией участвуют в сигнальном пути mTORC1,

регулирующим широкий спектр метаболических процессов клетки, в том числе блокирующим аутофагию, что может говорить об активации этого процесса [258].

Транскрипционные факторы, управляющие транскрипцией этих генов, представлены семейством NFY, факторами AR, SMAD4, E2F4, FOXM1.

3.3.4.2 Выявление ключевых транскрипционных факторов и сигнальных путей, участвующих в ответе здоровых клеток на обработку ХПС в течение 1 минуты

Результаты анализа ДЭГ с повышенной относительно контроля экспрессией для нетрансформированных клеток легкого Wi-38 представлены на рисунке 26.

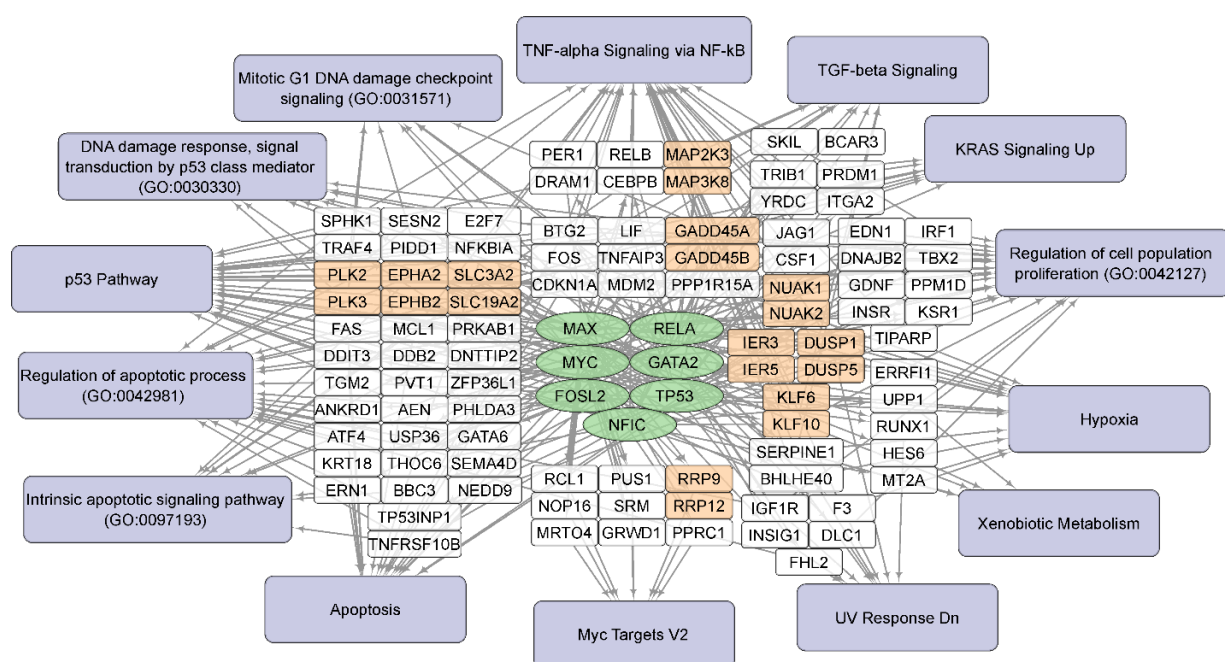


Рисунок 26 – Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) с повышенной относительно необработанного контроля экспрессией, выявленных в образцах нетрансформированных клеток Wi-38 после обработки ХПС в течение 1 мин. Активируемые транскрипционные факторы обозначены зеленым цветом, активируемые биологические процессы, сигнальные процессы, а также компоненты клетки, участвующие в этих процессах, обозначены фиолетовым цветом, ДЭГ – белым цветом, ДЭГ, принадлежащие в одному семейству генов, – оранжевым цветом.

Можно заметить, что на уровне процессов в данном случае также, как и в случае опухолевых клеток наблюдается обогащение терминов, связанных с сигнальными путями p53, NF-kB, KRAS, а также терминов, связанных с гипоксией и апоптозом, в том числе индуцированным повреждением геномной ДНК. В отличие от опухолевых клеток,

отсутствуют термины, связанные с ЭПР и его стрессом. Транскрипционные факторы, активирующие экспрессию генов, включают в себя MAX и MYC, RELA, TP53, GATA2 и NFIC.

Результаты функционального анализа генов с пониженной экспрессией для клеток Wi-38 представлены на рисунке 27.

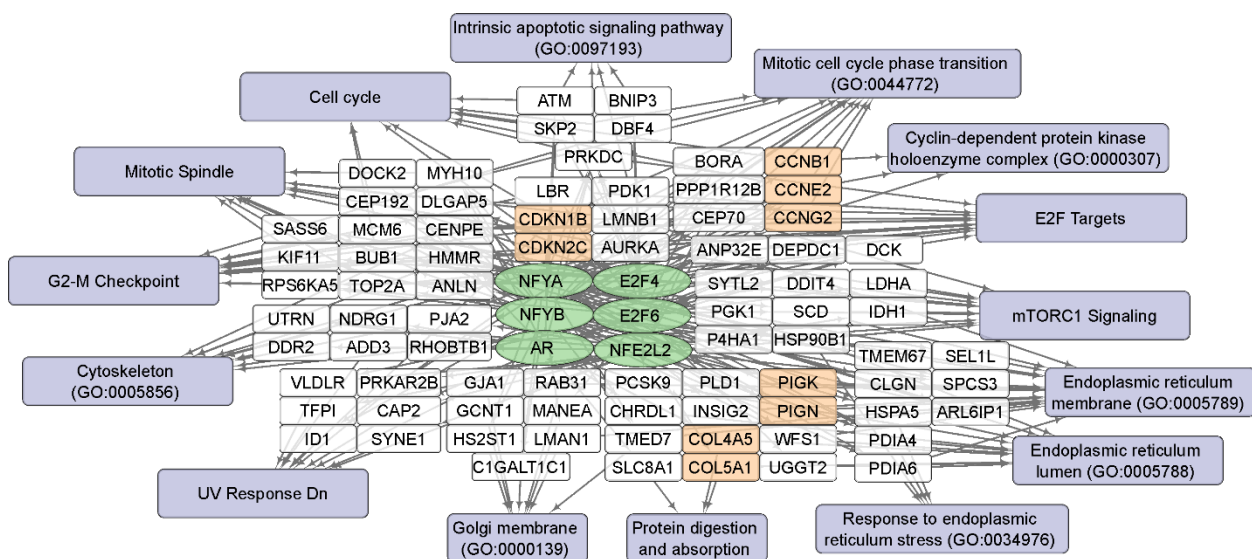


Рисунок 27 – Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) с пониженной относительно необработанного контроля экспрессией, выявленных в образцах нетрансформированных клеток Wi-38 после обработки ХПС в течение 1 мин. Транскрипционные факторы, активность которых подавляется, обозначены зеленым цветом, подавляемые биологические процессы, сигнальные процессы, а также компоненты клетки, участвующие в этих процессах, обозначены фиолетовым цветом, ДЭГ – белым цветом, ДЭГ, принадлежащие в одному семейству генов, – оранжевым цветом.

На представленной схеме можно, как и в случае клеток A-549 (Рисунок 25), можно видеть термины, соответствующие регуляции клеточного цикла, организации цитоскелета и веретена деления. Интересно, что в случае фибробластов легкого наблюдается снижение экспрессии генов, связанных с ответом на стресс ЭПР. Транскрипционные факторы, регулирующие экспрессию генов, связанных с прогрессией клеточного цикла, соответствуют таковым в опухолевых клетках. Уникальными терминами в данном случае является E2F6, а также NFE2L2, который активировался в опухолевых клетках в ответ на обработку ХПС (Рисунок 24). Можно предположить, что клетки Wi-38 подвергаются либо меньшему стрессовому воздействию при обработке ХПС, либо более эффективно преодолевают возникающий стресс, в том числе стресс ЭПР.

3.3.4.3 Выявление ключевых транскрипционных факторов и сигнальных путей, участвующих в ответе опухолевых и здоровых клеток на обработку ХПС в течение 2 минуты

Был также проведен анализ транскриптомов клеток, обработанных ХПС в течение 2 мин, через 3 ч после обработки. Из таблицы Б. и рисунка 22 видно, что в этих образцах было наименьшее количество ДЭГ – меньше 250 в каждом наборе генов. Для функционального анализа были выбраны гены, экспрессия которых изменилась более, чем в 1,41 ($2^{0,5}$) раз. Анализ проводился при помощи плагина ClueGO программы Cytoscape, использовались библиотеки GO Biological Process, GO Cellular Component, KEGG, Reactome Pathways, Reactome Reactions, WikiPathways. Данные представлены в виде схем, узлы которых соответствуют терминам библиотек. Размер узлов определяется достоверностью обогащения: чем меньше значение *p.value*, тем больше узел. Красным цветом обозначены узлы, более чем на 60% обогащенные генами с повышенной экспрессией, синим – более чем на 60% обогащенные генами с пониженной экспрессией. Термины, для которых узлы обозначены серым цветом, обогащаются генами из обоих наборов. Активация вероятных транскрипционных факторов анализировалась при помощи инструмента Enrichr с использованием библиотеки ENCODE and ChEA Consensus TFs from ChIP-X.

Стоит отметить, что результаты обогащения терминов наборами ДЭГ, соответствующими образцам клеток, обработанных ХПС в течение 2 мин, характеризуются сравнительно низким уровнем достоверности из-за малого количества ДЭГ и низкого порога изменения экспрессии. Особенно заметен этот факт для генов с пониженной экспрессией. Для большинства терминов в выбранных библиотеках скорректированное значение *p.value* составляет не менее 0,02 в сравнении с описанными выше результатами, где уровень значимости зачастую составлял менее 10^{-5} . По этой причине в результаты включено малое количество терминов.

В случае опухолевых клеток гены с повышенной экспрессией специфически обогащают термины, связанные с активацией транскрипционного фактора NFE2L2, а также с отрицательной регуляцией роста клеток и с клеточной гибелью (Рисунок 28).

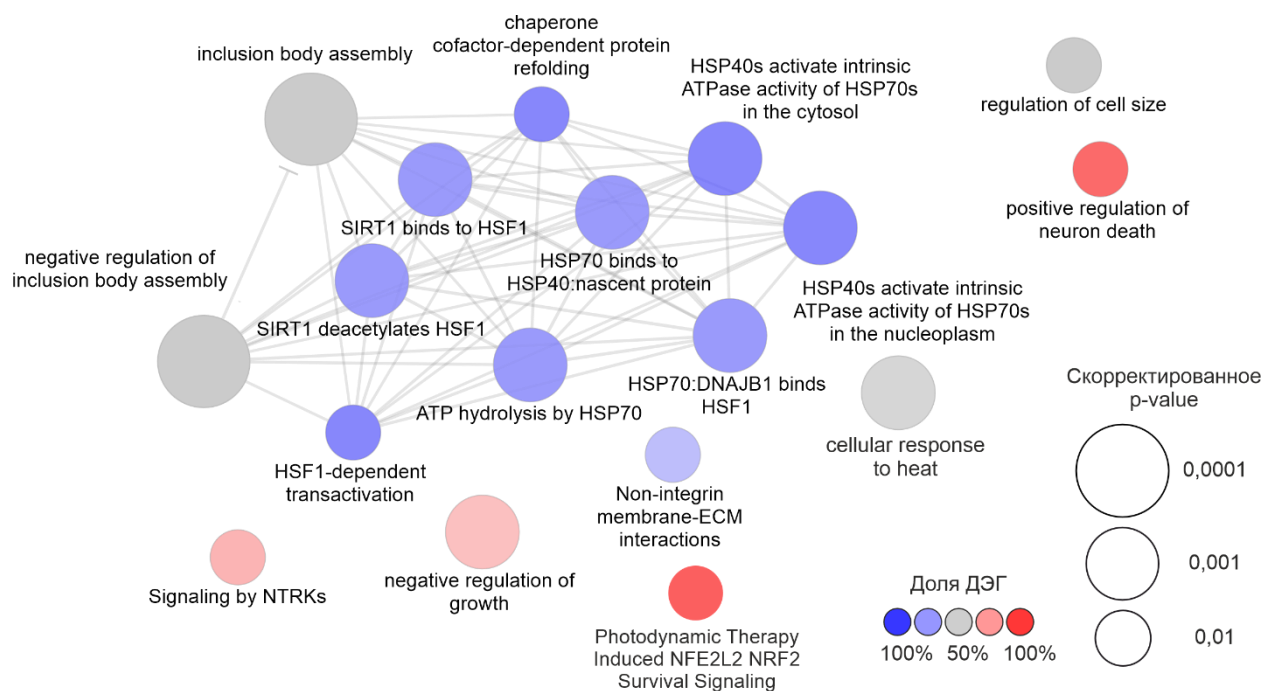


Рисунок 28 – Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов, выявленных в образцах опухолевых клеток А-549 через 3 ч после обработки ХПС в течение 2 мин. Красным цветом обозначены термины, обогащенные преимущественно ДЭГ с повышенной относительно контроля экспрессией, синим – преимущественно ДЭГ с пониженной относительно контроля экспрессией, серым цветом обозначены термины, обогащенные ДЭГ обеих групп.

Интересно, что гены с пониженной экспрессией обогащают термины, связанные с ответом клеток на тепловой шок, а именно каскад активации фактора HSF1, а также шаперон-зависимый рефолдинг белков. При этом гены, входящие в оба набора ДЭГ, участвуют в ответе клетки на тепловой шок и сборку телец включения. Стоит отметить, что белки теплового шока HSP70 и HSP90 при их транслокации на внешнюю поверхность служат маркерами иммуногенной гибели клеток.

Анализ активируемых транскрипционных факторов показал достоверное обогащение терминов, относящихся к факторам, указанным в таблице 10.

Таблица 10 - Транскрипционные факторы, регулирующие экспрессию генов в образцах клеток А-549 через 3 ч после обработки ХПС в течение 2 мин

Направление изменения экспрессии	Транскрипционный фактор	Скорректированное значение p.value
Повышенная экспрессия	CEBPD	$3,83 \times 10^{-04}$
	SOX2	$1,46 \times 10^{-03}$
	NFE2L2	$2,03 \times 10^{-03}$
	GATA2	$2,19 \times 10^{-03}$
	TCF3	$4,40 \times 10^{-03}$
	KLF4	$4,40 \times 10^{-03}$
	NELFE	$4,40 \times 10^{-03}$
Пониженная экспрессия	AR	$4,40 \times 10^{-02}$
	SMAD4	$8,70 \times 10^{-02}$

Для генов с повышенной экспрессией наблюдается активация факторов, присутствующих и в результатах анализа наборов генов, соответствующих обработке ХПС в течение 1 мин (Рисунок 24). Для генов с пониженной экспрессией также наблюдается активация факторов AR и SMAD4, как и для обработки ХПС в течение 1 мин (Рисунок 20).

В случае нетрансформированных клеток легкого Wi-38 достоверно обогащаются термины, связанные с биосинтезом белка (Рисунок 29).

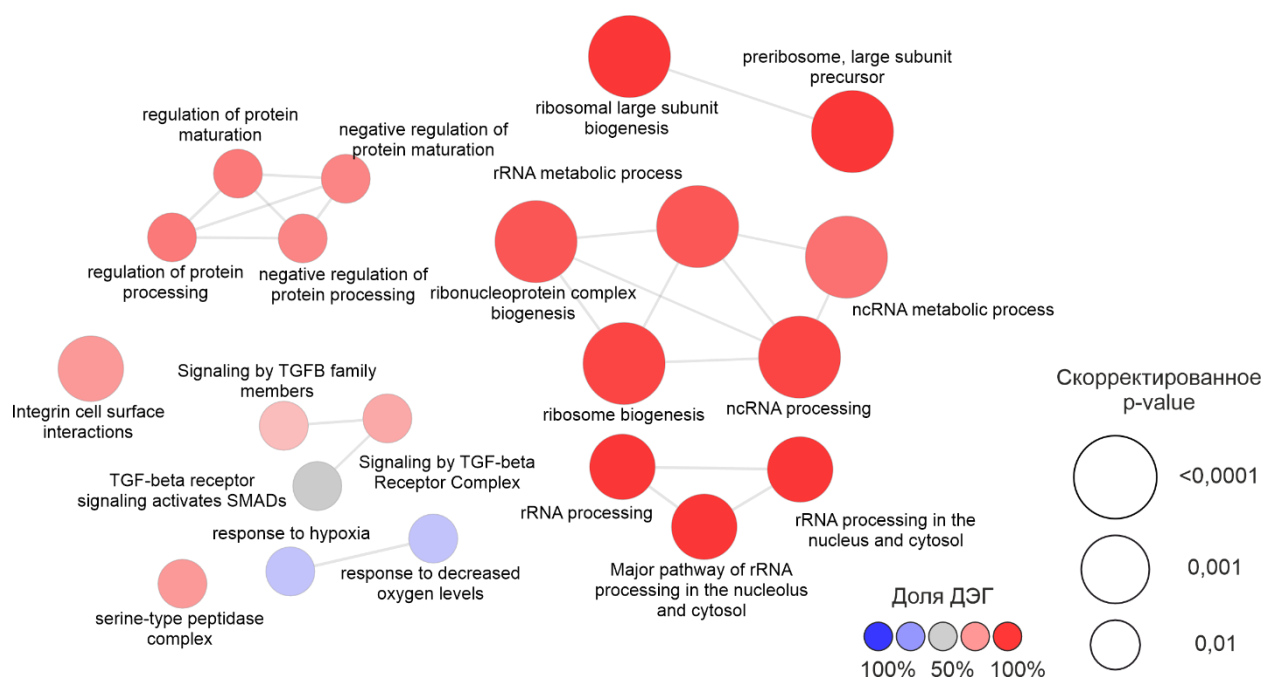


Рисунок 29 – Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов, выявленных в образцах неопухолевых клеток Wi-38 через 3 ч после обработки ХПС в течение 2 мин. Красным цветом обозначены термины, обогащенные преимущественно ДЭГ с повышенной относительно контроля экспрессией, синим – преимущественно ДЭГ с пониженной относительно контроля экспрессией, серым цветом обозначены термины, обогащенные ДЭГ обеих групп.

Гены с повышенной экспрессией участвуют в процессинге рибосомальной и некодирующей РНК, а также в биогенезе рибосом. Кроме того, наблюдается отрицательная регуляция процесса созревания белка. Гены с пониженной экспрессией достоверно обогащают только термины, связанные с ответом на гипоксию.

Анализ активируемых транскрипционных факторов показал достоверное обогащение терминов, относящихся к факторам, указанным в таблице 11.

Таблица 11 – Транскрипционные факторы, регулирующие экспрессию генов в образцах клеток Wi-38 через 3 ч после обработки ХПС в течение 2 мин

Направление изменения экспрессии	Транскрипционный фактор	Скорректированное значение p.value
Повышенная экспрессия	MYC	$3,44 \times 10^{-14}$
	MAX	$5,76 \times 10^{-12}$
	CREB1	$1,21 \times 10^{-07}$

Возможная активация факторов MYC и MAX была показана и для клеток Wi-38, обработанных ХПС в течение 1 мин (Рисунок 26), фактор CREB1 присутствовал в результатах анализа для клеток A-549 (Рисунок 24), но не Wi-38. Для генов с пониженной экспрессией в данном наборе ДЭГ не наблюдается достоверного обогащения терминов, связанных с какими-либо транскрипционными факторами.

Таким образом, в ходе проведенного анализа транскриптома опухолевых и неопухолевых клеток одного гистологического происхождения выявлены основные процессы и сигнальные пути, активируемые или подавляемые обработкой ХПС. Так, была показана активация путей, регулирующих ответ клетки на окислительный стресс и индуцированные стрессом повреждения биомолекул: ДНК и белков.

В публикациях других исследователей, изучавших изменения транскриптомов опухолевых клеток под действием холодной плазмы, были показаны активация сигнальных путей p53, MAPK, TNF, регуляция апоптотической гибели клеток, а также возможный стресс митохондрий и ЭПР при непрямой обработке плазмой [156,158,159], что согласуется с полученными в данной работе данными. При этом в литературе отсутствуют данные об изменении транскриптомов клеток неопухолевого происхождения под действием ХПС, исследователи либо не проводят таких исследований, либо отмечают полное отсутствие эффекта [158]. В данной работе показана регуляция экспрессии большого количества уникальных генов при обработке ХПС в фибробластах легкого Wi-38, однако при функциональном анализе ДЭГ показана, в основном, регуляция таких же процессов, как и в опухолевых клетках. Амплитуда индуцированных изменений при этом была значительно ниже для нетрансформированных клеток, чем для опухолевых, что может объяснять их большую жизнеспособность после обработки ХПС.

3.4 Молекулярные механизмы, задействованные в ответе клеток на обработку ХПС

При функциональном анализе ДЭГ в образцах, обработанных ХПС опухолевых и нетрансформированных клеток, было показано, что большую часть обогащаемых терминов составляют термины, относящиеся к регуляции клеточного цикла, а также ответа на повреждение ДНК и стресс ЭПР. Кроме того, в экспериментах по изучению жизнеспособности клеток в режиме реального времени было показано, что ХПС оказывает цитостатическое влияние на опухолевые клетки.

3.4.1 Изменение экспрессии генов раннего ответа на стресс в клетках, обработанных ХПС

Для подтверждения данных транскриптомного были выбраны гены *FOS*, *ATF3*, *GADD45B*, *KLF4*, вовлеченные в ранний ответ клеток на стресс. Экспрессию этих генов оценивали при помощи ОТ-ПЦР РВ с использованием ген-специфических праймеров, уровни белков *ATF3* и *GADD45B* исследовали при помощи вестерн-блота с использованием антител к выбранным белкам через 3 и 24 ч после обработки ХПС. Результаты анализа представлены на рисунке 30.

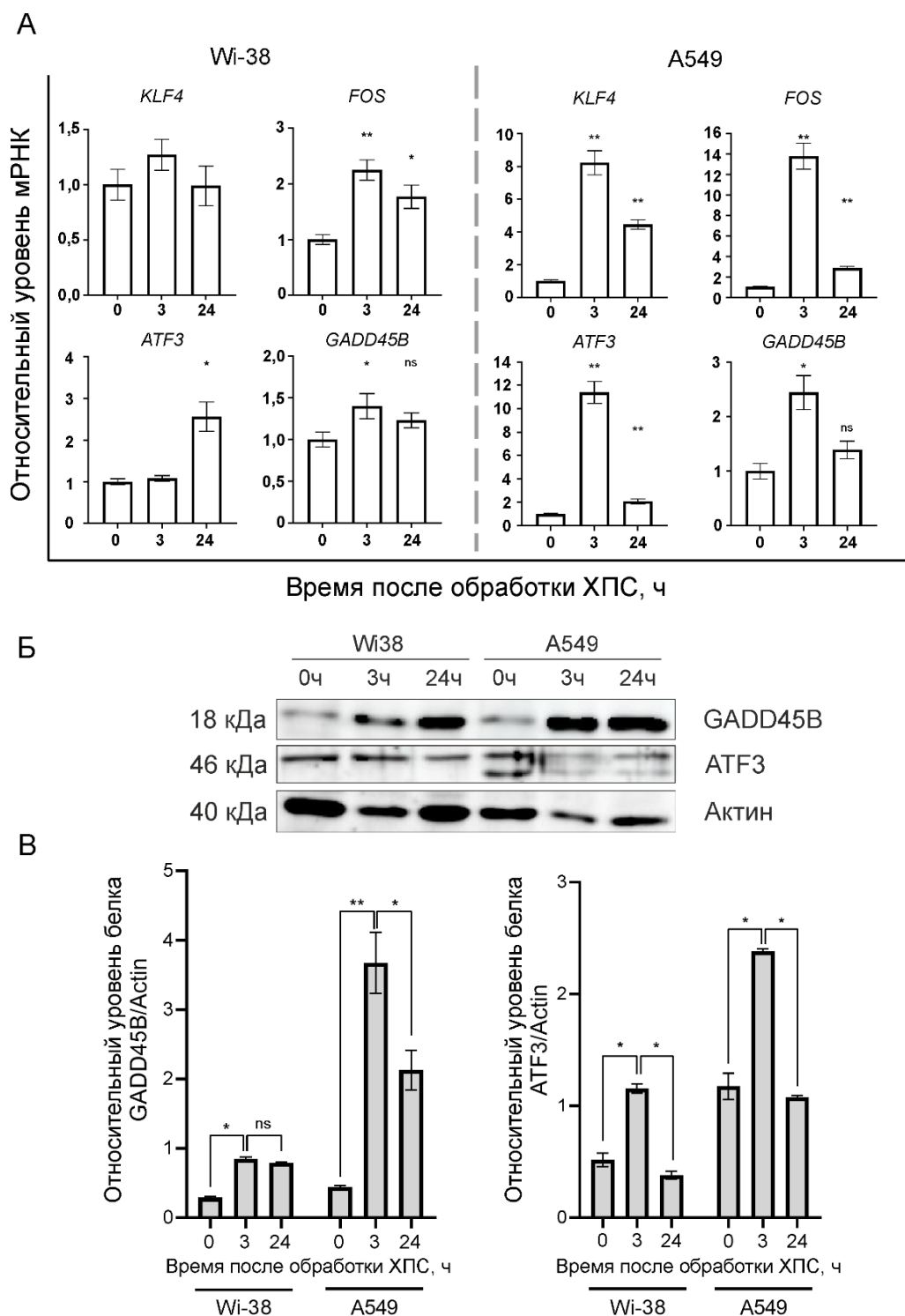


Рисунок 30 – Изменения уровней экспрессии генов *KLF4*, *FOS*, *ATF3*, *GADD45B* после обработки ХПС на уровне мРНК и на уровне белка. А – относительный уровень мРНК генов через 3 и 24 ч после обработки ХПС, измеренный методом ОТ-ПЦР РВ, Б – относительные уровни белков GADD45B и ATF3 через 3 и 24 ч после обработки ХПС, измеренные методом вестерн-блоттинга, В – обсчет данных вестерн-блота. Результаты представлены как среднее значение, рассчитанное по четырем (для ОТ-ПЦР РВ) или по двум повторам (для вестерн-блота) повторам $\pm$ стандартное отклонение. Статистическая значимость обозначена как ns: $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, тест Манна-Уитни.

Уровни мРНК исследуемых генов изменяются под действием ХПС. В случае опухолевых клеток, наблюдается схожая динамика для всех генов – увеличение экспрессии через 3 ч после обработки ХПС и повышенный, но близкий к контрольному значению уровень через 24 ч после обработки. Для нетрансформированных клеток легкого прослеживаются похожие изменения экспрессии, однако, как и в случае транскриптомного анализа, амплитуда изменений экспрессии гораздо меньше, чем для опухолевых клеток.

Изменения уровней белковых продуктов генов *ATF3* и *GADD45B* соответствуют изменению уровней мРНК этих генов и демонстрируют схожую динамику, однако отличаются по амплитуде изменений. Уровень белка ATF3 регулируется не только активностью транскрипции, но и увеличением стабильности мРНК этого гена в стрессовых условиях [259], а также быстрой деградацией этого белка в норме [260]. В литературе встречаются данные о повышении стабильности мРНК гена *GADD45B* в стрессовых условиях, однако не описывается механизм этой стабилизации [261].

3.4.2 Изменения в прогрессии клеточного цикла клеток, обработанных ХПС

Для более подробного изучения влияния ХПС на клеточный цикл опухолевые клетки А-549 и здоровые фибробласты легкого Wi-38 и MRC-5 обрабатывали ХПС в течение 30с и 1 минуты, через 24 ч фиксировали и окрашивали йодидом пропидия с последующим анализом методом проточной цитометрии. Окрашивание геномной ДНК PI позволяет дискриминировать клетки с диплоидным и тетраплоидным набором хромосом. В качестве положительного контроля использовали колхицин (1,5 мкМ), который блокирует формирование веретена деления в митозе. Для ингибирования эффектов АФКА использовали N-ацетилцистеин (NAC, 5 мМ). SH-группа N-ацетилцистеина способна напрямую вступать в реакцию с АФКА и участвовать в регуляции активности белков метаболизма глутатиона, таких как глутатионредуктаза. Результаты анализа приведены на рисунке 31.

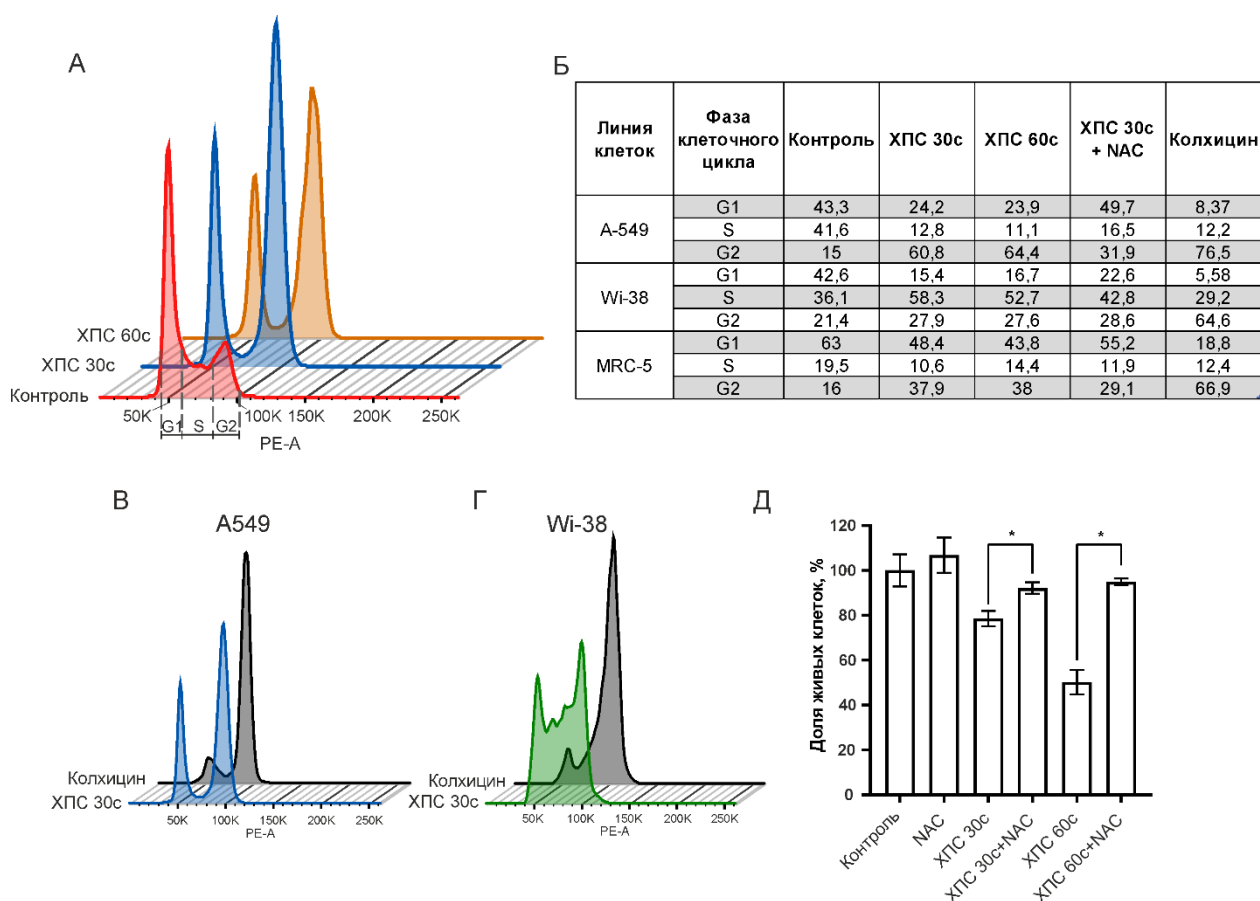


Рисунок 31 – Анализ влияния обработки ХПС на распределение клеток по фазам клеточного цикла и роль N-ацетилцистеина в ослаблении эффекта ХПС. А – пример типичного распределения клеток А-549 по фазам клеточного цикла, наблюдаемое при оценке методом проточной цитометрии. Б – результаты анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла методом проточной цитометрии. В – остановка клеточного цикла под действием колхицина (1,5 мкМ) в клетках А-549 и Г – Wi-38. Д – влияние N-ацетилцистеина (5 мМ) на жизнеспособность клеток культуры А-549, оцененная методом МТТ-теста. Результаты МТТ-теста представлены как среднее значение трех повторов $\pm$ стандартное отклонение. Статистическая значимость обозначена как $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, тест Манна-Уитни.

Обработка ХПС приводит в блокированию перехода опухолевых клеток в митоз (Рисунок 31А,Б), причем этот эффект наблюдается как для обработки в течение 30 с, так и более продолжительной обработки в течение 60 с. В фибробластах легкого Wi-38 и MRC-5 также наблюдается увеличение доли клеток в фазе G2 клеточного цикла, однако значительно меньшее, чем в случае опухолевых клеток. Стоит отметить, что эффект ХПС на распределение клеток по фазам клеточного цикла схож с таковым при обработке клеток колхицином (Рисунок 31В,Г). Добавление N-ацетилцистеина к клеткам до обработки ХПС

приводило к уменьшению доли клеток в фазе G2 (Рисунок 31Б), что хорошо согласуется с данными жизнеспособности клеток: предобработка НАС уменьшала цитотоксический эффект ХПС (Рисунок 31Д).

3.4.3 Повреждение геномной ДНК в клетках, обработанных ХПС

Одним из важных событий, приводящих к остановке клеточного цикла перед делением клетки, является повреждение геномной ДНК. Данные, полученные в ходе анализа транскриптома и исследования прогрессии клеточного цикла в обработанных ХПС клетках, а также повышенная экспрессия GADD45B позволяют предположить повреждение геномной ДНК в клетках, обработанных ХПС.

3.4.3.1 Оценка динамики повреждений ДНК клеток под действием холодной плазмы методом ДНК-комет

Для оценки степени повреждения геномной ДНК использовали щелочной вариант метода ДНК-комет. В этом методе клетки смешивают с раствором легкоплавкой агарозы и полученную суспензию переносят на предметные стекла. Далее проводят лизис клеток в агарозе, после чего помещают слайды в щелочные условия для проведения щелочного гидролиза поврежденной ДНК. Проводят электрофорез, в ходе которого поврежденная ДНК мигрирует в геле к аноду, таким образом формируется ДНК-комета с неповрежденной ДНК в голове кометы и поврежденной ДНК в хвосте. Клетки аденокарциномы легкого А-549 обрабатывали ХПС и через 1-24 ч проводили анализ. В качестве положительных контролей использовали пероксид водорода в концентрации 500 мкМ и блеомицина сульфат в концентрации 30 мкМ. Считается, что пероксид водорода приводит преимущественно к одноцепочечным разрывам и окислительным повреждениям, тогда как блеомицин индуцирует двуцепочечные разрывы. Однако существуют данные, что оба этих соединения могут приводить к окислительным повреждениям оснований и сахарофосфатного остова, одноцепочечным и двуцепочечным разрывам ДНК [262,263]. Для каждой экспериментальной точки подсчитывали не менее 140 комет (Рисунок 32).

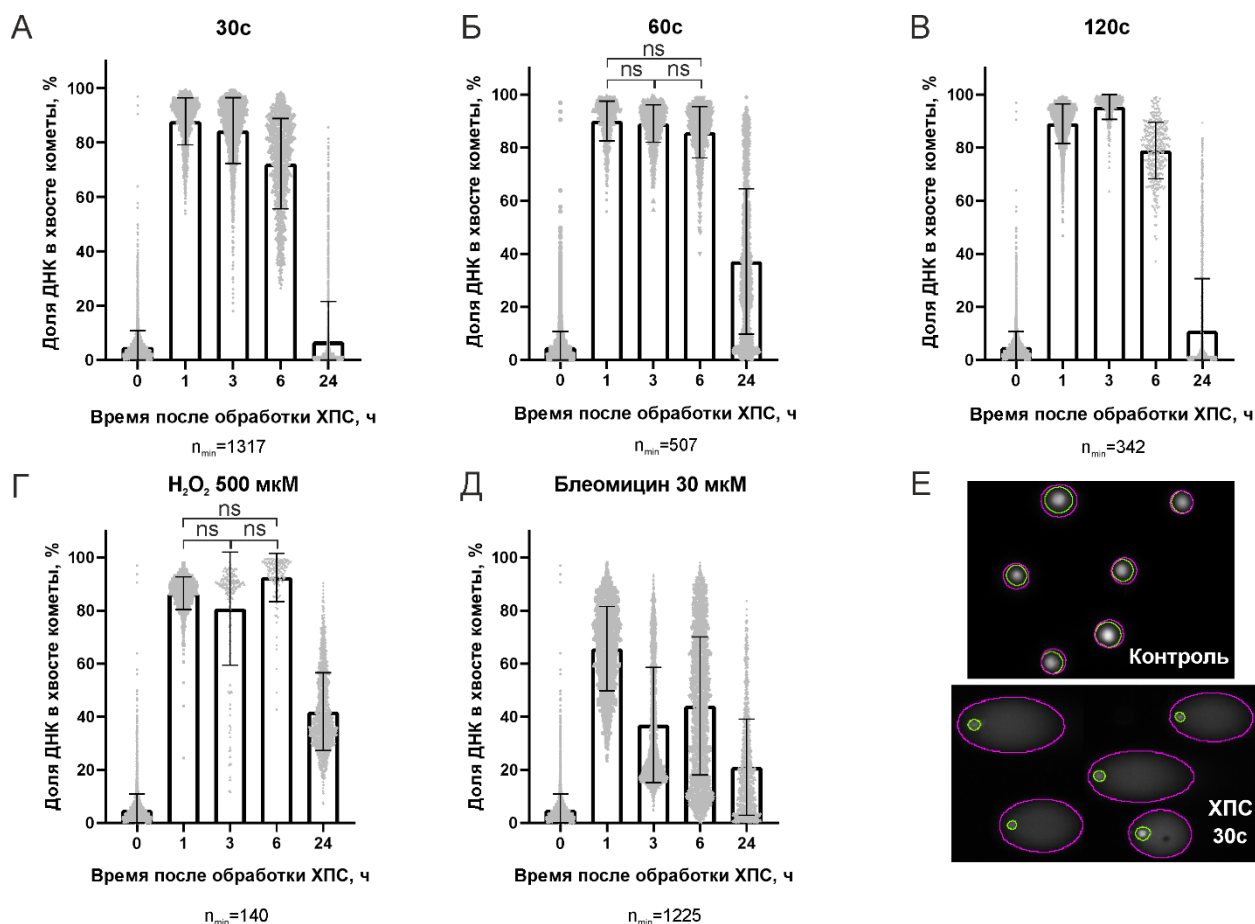


Рисунок 32 – Анализ динамики повреждений ДНК и их репарации в клетках А-549 методом ДНК-комет. Представлены результаты для клеток, обработанных ХПС в течение А – 30с, Б – 60с, В – 120с, а также для клеток, обработанных В – пероксидом водорода, Д – блеомицина сульфатом. Е – характерный вид ДНК-комет в контрольном образце и образце клеток, обработанных ХПС в течение 30с через 1 час после обработки: фиолетовым цветом обозначены кометы, зеленым – «головы» комет. Результаты представлены как среднее значение, рассчитанное по двум повторам $\pm$ стандартное отклонение. Минимальное количество подсчитанных ДНК-комет ($n_{\min}$) указано под каждым графиком. Статистическая значимость результатов рассчитана с использованием критерия Краскела-Уоллиса с поправкой на множественные сравнения. Различия между группами статистически значимы с $p < 0.005$. Статистически незначимые результаты обозначены на рисунке как ns: $p > 0.05$.

Из полученных результатов видно, что обработка ХПС в дозах 30, 60 и 120с приводит к резкому увеличению доли поврежденной ДНК в клетках через 1 час после обработки. При обработке клеток в течение 30 с далее наблюдается снижение доли поврежденной ДНК к 3 и 6 часам с полным восстановлением к 24 часам после обработки (Рисунок 32А). Для клеток, обработанных в течение 60 с (Рисунок 32Б) наблюдается более

медленное снижение к 3 и 6 часам, через 24 ч большая часть клеток демонстрирует уровень, неотличимый от контрольного уровня, однако для другой части клеток характерна высокая доля поврежденной ДНК, что может быть вызвано продолжающимся окислительным стрессом, индуцированным в том числе в ходе программируемой гибели клеток. В случае клеток, обработанных ХПС в течение 120 с наблюдается увеличение доли поврежденной ДНК в течение 3 часов с последующим снижением (Рисунок 32В) и возвращением к уровню контрольных клеток к 24 часам. Количество проанализированных комет в этой экспериментальной точке мало (соответствует $n_{\min}$), что обусловлено гибелью большей части клеток. Повреждения ДНК в выживших клетках подвергаются репарации.

3.4.3.2 Изменение уровней фосфорилированного гистона H2AX и убиквитин-лигазы MDM2 в ответ на обработку ХПС

Ответ на поврежденную ДНК включает в себя разнообразные сигнальные каскады, определяемые типом повреждения. При возникновении двуцепочечных разрывов в ДНК происходит фосфорилирование гистона H2AX, маркируя области генома в районе повреждения для привлечения репарационных комплексов. Кроме того, ответ на поврежденную ДНК регулирует транскрипционный фактор TP53, активация которого была показана при транскриптомном анализе. Важным регулятором активности TP53 является убиквитин-лигаза MDM2, которая обеспечивает низкий уровень TP53 в отсутствии стресса [264]. Изменение уровня фосфорилированной формы гистона H2AX и белка MDM2 в клетках через 3 и 24 ч после обработки ХПС в течение 60с оценивали вестерн-блотом (Рисунок 33).

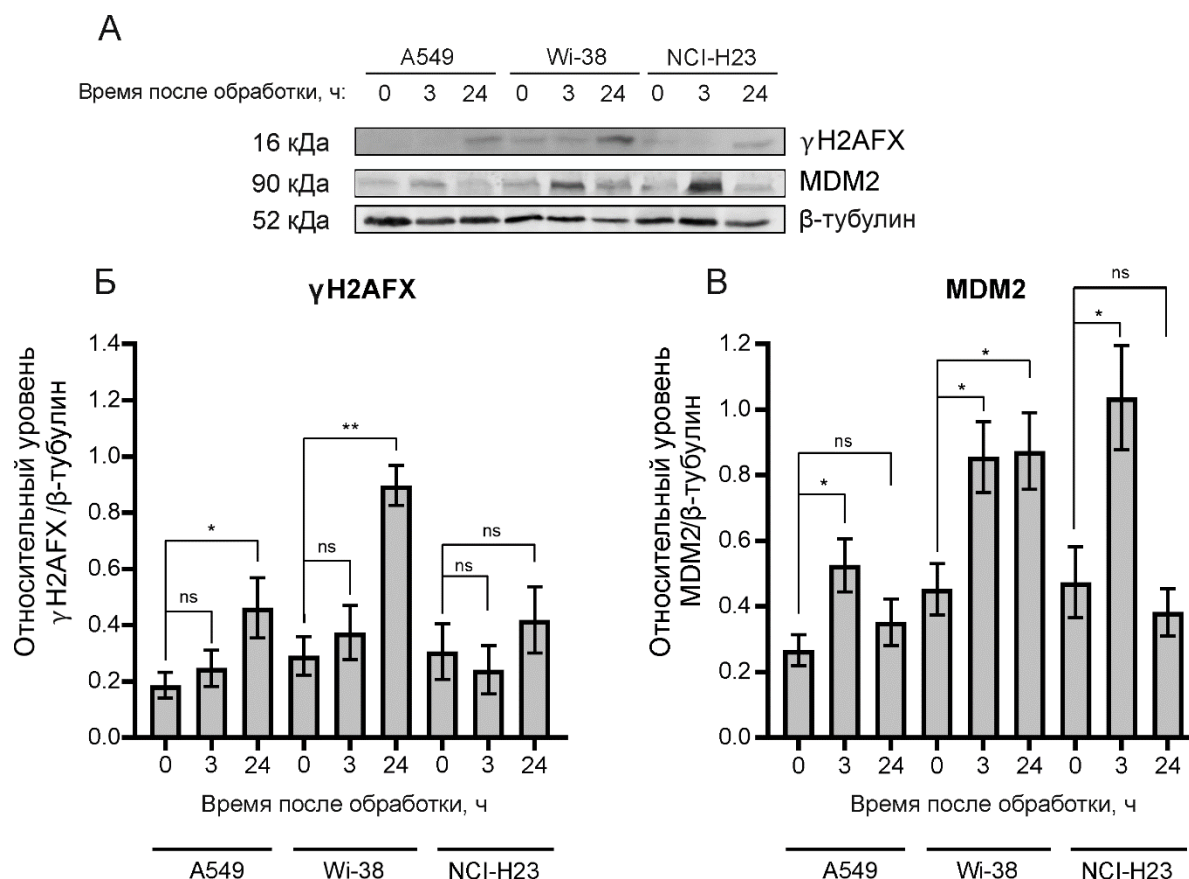


Рисунок 33 – Изменение уровня фосфорилированной формы гистона H2AX и белка MDM2 в клетках аденокарциномы легкого A-549 и NCI-H23, а также фибробластах легкого Wi-38 после обработки ХПС в течение 60с. А – репрезентативные изображения вестерн-блот анализа лизатов клеток после обработки ХПС. Б – обсчет данных вестерн-блота по фосфорилированной форме гистона H2AX, В – по белку MDM2. Результаты представлены как среднее значение двух повторов $\pm$ стандартное отклонение. Статистическая значимость обозначена как ns: $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, тест Манна-Уитни.

Интересно, что динамика уровня фосфорилированной формы гистона H2AX (Рисунок 33Б) демонстрирует расхождение с данными метода ДНК-комет. С использованием последнего показано, что повреждения ДНК, вызванные обработкой клеток ХПС, репарируются к 24 часам в большинстве клеток. При этом уровень фосфорилированного гистона H2AX демонстрирует рост к 24 часам, что может быть обусловлено несколькими причинами. Показано, что фосфорилирование этого гистона является ранней модификацией хроматина при фрагментации ДНК в процессе апоптоза [265]. Кроме того, фосфорилирование H2AX может происходить при репликативном стрессе [266].

В случае белка MDM2 можно видеть увеличение уровня к 3 часам после обработки ХПС в клетках всех культур (Рисунок 33В). К 24 часам уровень этого белка остается

повышенным только в фибробластах. MDM2 фосфорилируется киназой ATM в ответ на повреждение ДНК, высвобождая TP53 и предотвращая его убиквитинилирование, при этом транскрипция MDM2 регулируется самим TP53, формируя петлю отрицательной обратной связи [267]. Увеличение уровня MDM2 после обработки ХПС связано, вероятнее всего, с активацией транскрипционного фактора TP53, который остается активным в фибробластах легкого и через 24 часа, предотвращая дальнейшее повреждение ДНК. Кроме того, транскрипция гена *MDM2* активируется связыванием с его промотором транскрипционного фактора NF-κB, активация которого показана при транскриптомном анализе [268].

3.4.4 Индукция стресса эндоплазматического ретикулума в ответ на обработку ХПС

3.4.4.1 Транскрипционная регуляция ответа на стресс ЭПР в ответ на обработку клеток ХПС

При анализе транскриптома опухолевых клеток, обработанных ХПС, наблюдали транскрипционные признаки индукции ответа на стресс ЭПР: увеличение экспрессии генов транскрипционных факторов ATF4, DDIT3, ко-шаперонов DNAJB2, DNAJB9, регуляторной субъединицы 15A фосфатазы 1 PPP1R15A (GADD34) (Рисунок 24).

Экспрессию генов *ATF4* и *DDIT3* оценивали методом ОТ-ПЦР РВ в клетках А-549, после обработки ХПС. В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные индукторами стресса ЭПР: антибиотик туникамицин (0.5 мкг/мл), нарушающий N-гликозилирование белков в ЭПР, а также дитиотреитол (ДТТ, 4мМ), препятствующий формированию дисульфидных связей [269]. Результаты анализа представлены на рисунке 34.

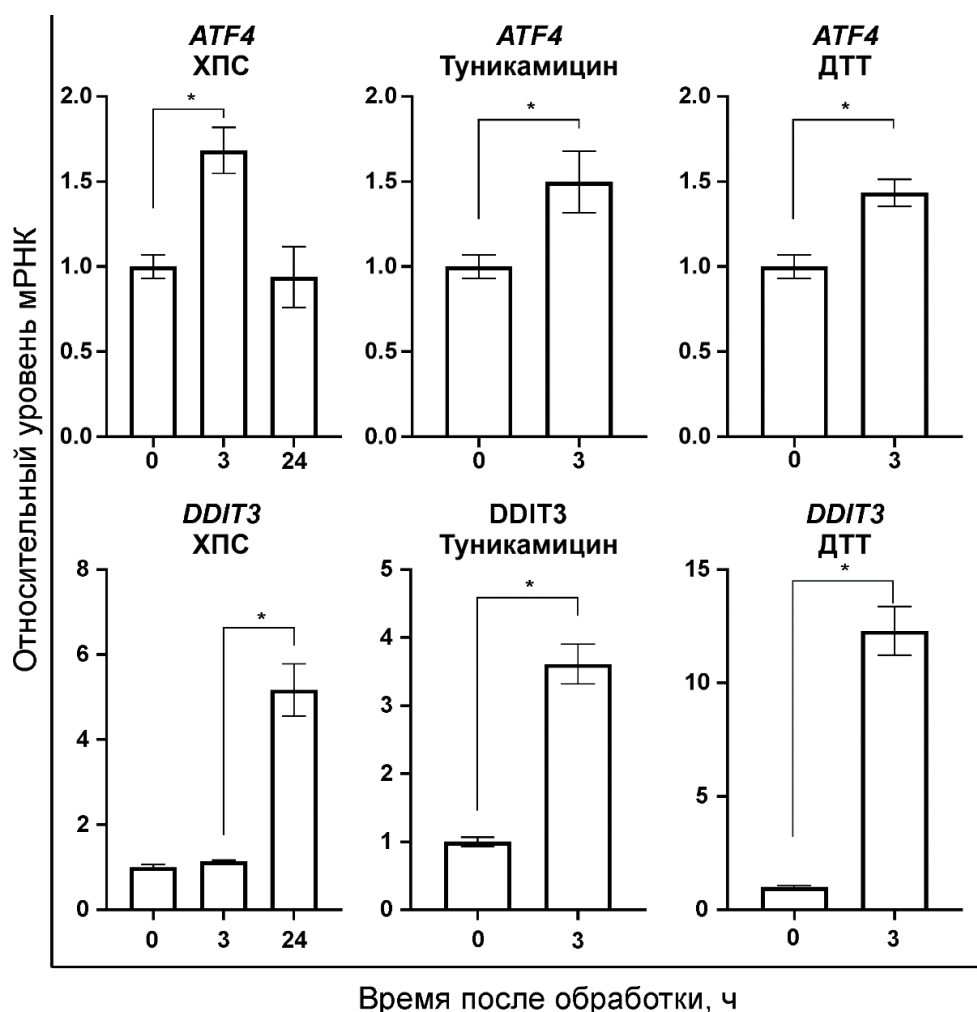


Рисунок 34 – Изменение экспрессии генов *ATF4* и *DDIT3* в клетках аденокарциномы легкого А-549 в ответ на обработку ХПС, инкубацию с туникамицином (0.5 мкг/мл) и дитиотреитолом (4 мМ). Данные анализа методом ОТ-ПЦР РВ, проведенного через 3 и 24 ч после обработки. Результаты представлены как среднее значение двух повторов $\pm$ стандартное отклонение. Статистическая значимость обозначена как $*p \leq 0.05$ относительно контрольного образца, тест Манна-Уитни.

Результаты ОТ-ПЦР РВ согласуются с данными анализа транскриптома обработанных клеток. Уровень мРНК гена *ATF4* увеличивается через 3 ч после обработки ХПС и возвращается к базовому уровню через 24 ч после обработки. Увеличение уровня мРНК *ATF4* наблюдается также под действием индукторов стресса ЭПР.

Интересно, что для мРНК гена *DDIT3* наблюдается различная динамика в клетках, обработанных ХПС, и в клетках, инкубированных с туникамицином или ДТТ. Так, в клетках через 3 ч после обработки ХПС не наблюдается статистически значимого увеличения уровня мРНК относительно необработанных клеток, тогда как туникамицин и

ДТТ стимулируют резкое увеличение экспрессии этого гена. Тем не менее, обработка ХПС стимулировала повышение экспрессии *DDIT3* через 24 ч.

3.4.4.2 Изменение ультраструктуры эндоплазматического ретикулума клеток после обработки ХПС

Анализировали также ультраструктуру клеток после обработки ХПС. Клетки обрабатывали в течение 1 мин и через 6 часов открепляли от подложки и производили фиксацию образцов. Подготовка образцов и просвечивающая электронная микроскопия была выполнена в группе микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН Полетаевой Ю.Е. Фотографии клеток представлены на рисунке 35.

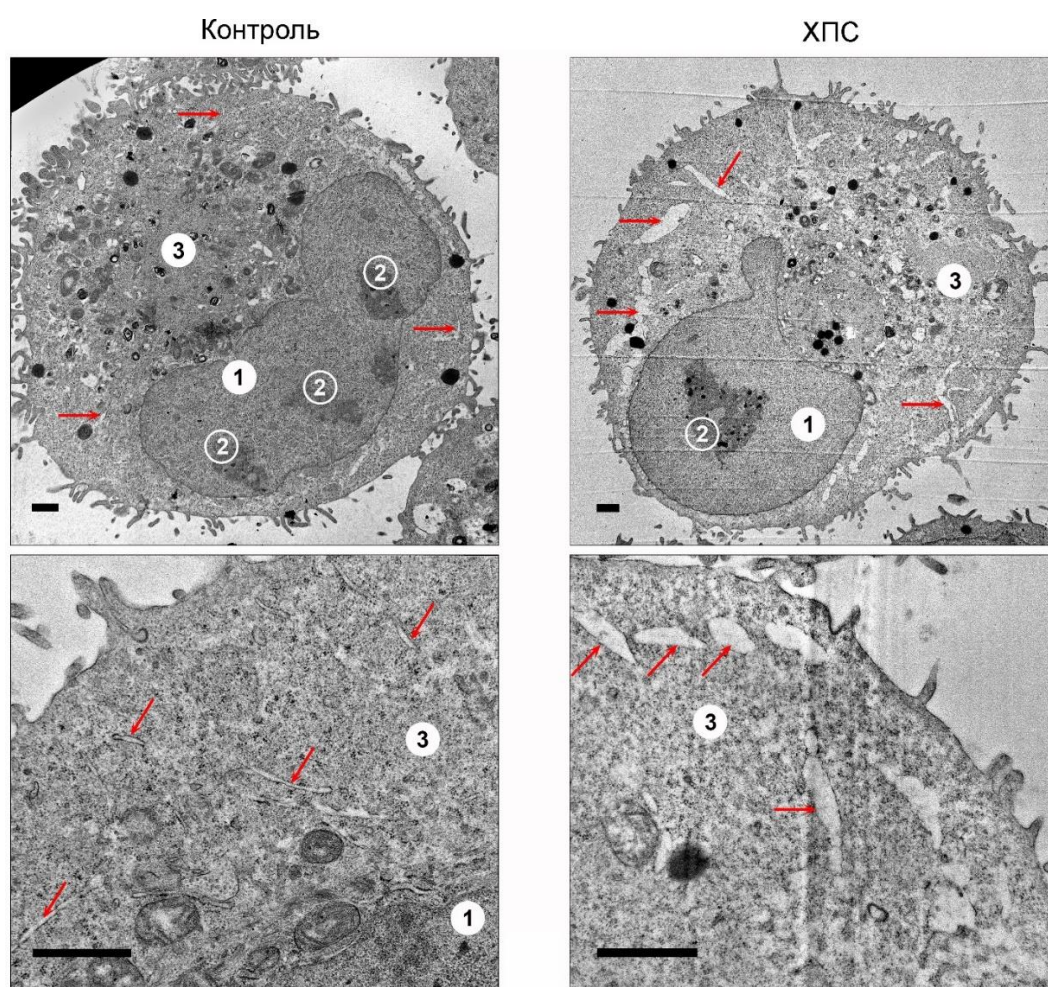


Рисунок 35 – Микрофотографии клеток аденокарциномы легкого А-549 через 6 часов после обработки ХПС в течение 60 с. Представлены репрезентативные изображения клеток. Цифрами обозначены: 1 – ядро, 2 – ядрышко, 3 – цитоплазма, стрелками показан просвет ЭПР. Масштабная метка соответствует 1 мкм.

Наибольшие изменения в ультраструктуре клеток затрагивают ЭПР. Можно видеть, что обработка ХПС приводит к расширению просвета ЭПР в клетках. Расширение просвета ЭПР показано для клеток трабекулярной сети глаза, подвергнутых действию препаратов, индуцирующих стресс ЭПР [270].

Кроме того, при электронной микроскопии клеток после обработки ХПС были обнаружены изменения в ядрышках клеток (Рисунок 36).

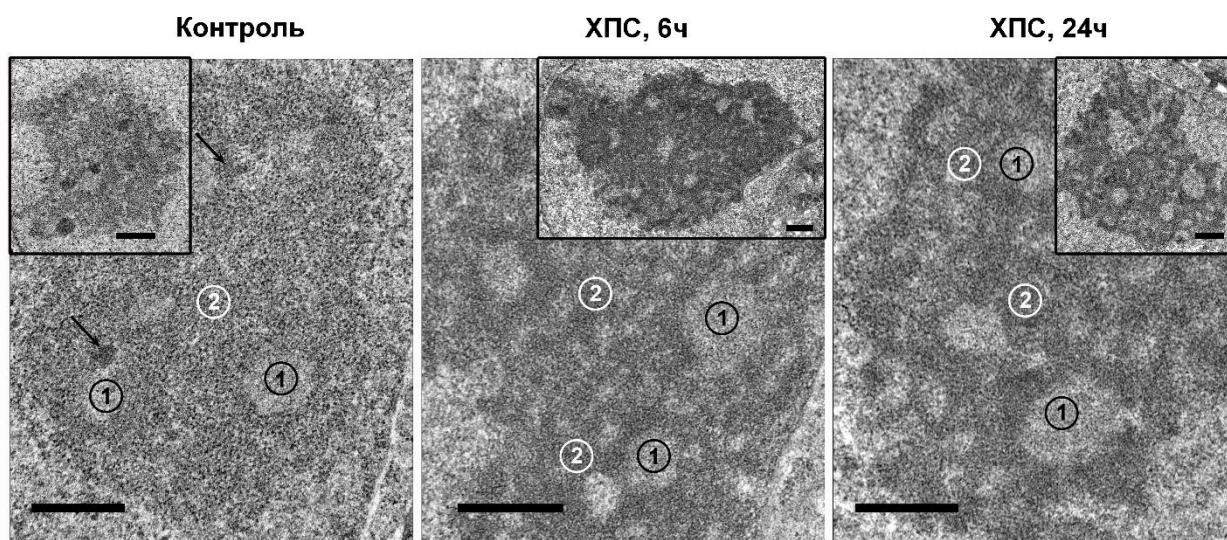


Рисунок 36 – Микрофотографии ядрышек клеток аденокарциномы легкого А-549 через 6 и 24 часов после обработки ХПС в течение 60 с. Представлены репрезентативные изображения ядрышек и их увеличенные изображения. Цифрами обозначены: 1 – фибриллярная зона, 2 – гранулярная зона, стрелками показан плотная фибриллярная зона. Масштабная метка соответствует 500 нм.

Можно видеть, что ядрышки в необработанных клетках характеризуются средней электронной плотностью, хорошо различимы фибриллярные зоны. Гранулярная зона имеет среднюю электронную плотность. Обработка ХПС приводит к увеличению электронной плотности фибриллярной и гранулярной зон ядрышка, причем эти изменения сохранялись и через 24 ч после обработки. Изменения в структуре ядрышка могут быть обусловлены нарушениями синтеза рибосомальной РНК и сборки рибосом. Кроме того, в литературе встречаются данные о важной функции ядрышка при накоплении в ядре несвернутых белков – ядрышко служит компартментом, в гранулярной зоне которого формируются отдельные фазы, состоящие из белков, связанных с шаперонами семейства Hsp70, за счет этого предотвращается агрегация белков и, по окончании стрессового воздействия, восстанавливается их трехмерная структура [271].

Кроме того, ранее в работе нашей группы было показано, что обработка ХПС стимулирует транслокацию белка кальретикулина (CRT) из ЭПР на внешнюю плазматическую мембрану клетки, также, как и белка Hsp70, что дополнительно подтверждает стресс ЭПР под действием ХПС [5].

Известно, что ответ клетки на стресс ЭПР, вызванный накоплением несвернутых белков и белков с нарушенной третичной структурой, зависит от концентрации стимула и продолжительности воздействия, при этом могут индуцироваться как аутофагия, приводящая к выживанию, так и апоптоз, приводящий к гибели клетки [272]. Косвенное подтверждение активации обоих этих процессов можно найти в результатах описанного выше функционального анализа ДЭГ: в терминах присутствуют и активация апоптоза, и ингибирование каскада mTORC1, которое может приводить к индукции аутофагии (Рисунки 25 и 27).

3.4.5 Индукция аутофагии в ответ на обработку клеток ХПС

Активация аутофагии может приводить как к выживанию клеток, так и к гибели. Более того, индукция аутофагии может: 1) совпадать во времени с индукцией гибели клеток по другому пути, например, по пути апоптоза; 2) запускать гибель клетки по другому пути; 3) быть причиной гибели клеток [273]. В двух последних случаях ингибирование аутофагии может предотвратить гибель клеток.

Индукция аутофагии в клетках после обработки холодной плазмой исследовалась на клетках рака эндометрия человека АМЕС [274], было показано, что гибель клеток зависела от аутофагии, ингибитор последних стадий аутофагии восстанавливал жизнеспособность клеток. На клетках глиобластомы человека U373MG была показана индукция независимого от каспаз типа клеточной гибели, сопровождающегося накоплением лизосом и пермеабиллизацией мембран, применение ингибитора ранних стадий аутофагии – 3-метиладенина – незначительно уменьшало цитотоксический эффект ХПС, однако не восстанавливало жизнеспособность клеток до контрольного уровня [275]. Маркеры аутофагии: p62 и LC3II не подвергались значительному изменению. Авторы заключают, что аутофагия не вносит вклад в гибель клеток после обработки ХПС.

По современным представлениям индукция аутофагии происходит в том числе как следствие выхода NFE2L2 из комплекса Cul3/KEAP1/NFE2L2, где окисление остатков цистеина в KEAP1 является сенсором окислительного стресса. Высвобожденный транскрипционный фактор NFE2L2, как было отмечено в обзоре литературы, транслоцируется в ядро, где регулирует транскрипцию целевых генов, а комплекс KEAP1 с

убиквитин-лигазой Cul3 взаимодействует с белком p62. Результатом взаимодействия становится убиквитинирование p62 по лизину 420, которое стимулирует олигомеризацию белка и инициацию аутофагии, способствующей преодолению клеткой протеотоксического стресса [276]. Интересно, что, с другой стороны, индукция селективной аутофагии агрегатов белков и поврежденных митохондрий приводит к фосфорилированию белка p62 по серину 403. В такой форме он взаимодействует с KEAP1, также разрушая комплекс последнего с Nrf2 [277]. Таким образом, регуляция транскрипции генов ответа на окислительный стресс существенно взаимосвязана с активацией аутофагии.

3.4.5.1 Транскрипционная регуляция генов-участников аутофагии в обработанных ХПС клетках

На первом этапе оценивали экспрессию генов ключевых белков, участвующих в аутофагии: *SQSTM1*, кодирующего белок p62, и *MAP1LC3B*, кодирующего белок LC3B, в опухолевых и здоровых клетках через 3 и 24 ч после обработки ХПС (Рисунок 37).

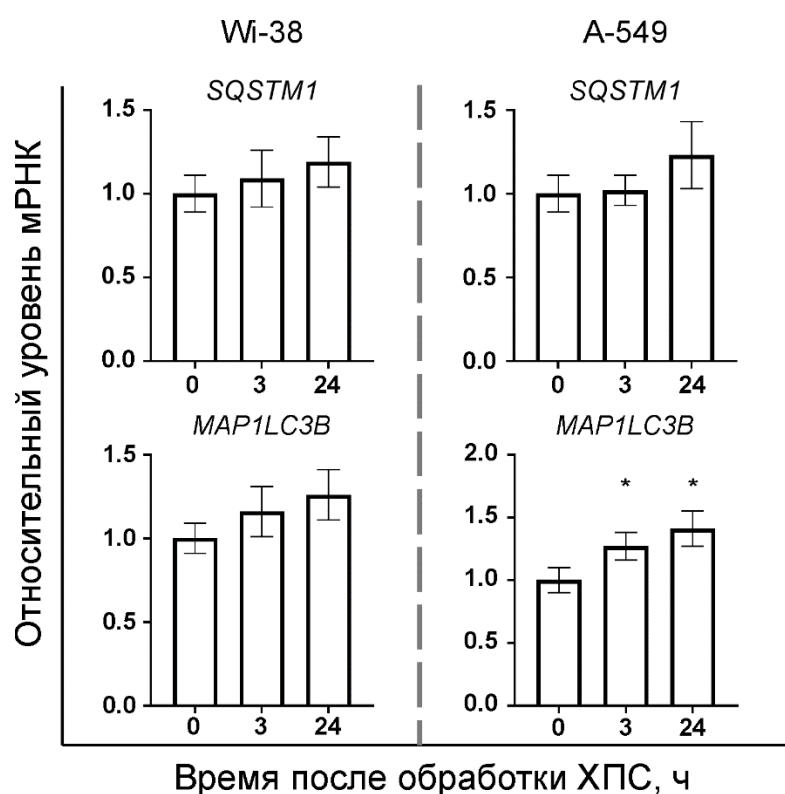


Рисунок 37 – Экспрессия генов *SQSTM1* и *MAP1LC3B* в клетках Wi-38 и A-549 через 3 и 24 ч после обработки ХПС. Данные ОТ-ПЦР РВ. Результаты представлены как среднее значение четырех повторов $\pm$ стандартное отклонение. Статистическая значимость обозначена как * $p \leq 0.05$ относительно контрольного образца, тест Манна-Уитни.

Экспрессия выбранных генов незначительно увеличивалась после обработки. Статистически достоверные изменения были выявлены только для гена *MAP1LC3B* в опухолевых клетках. Стоит отметить, что экспрессия этих генов зависит от активности транскрипционного фактора ATF4, что может обуславливать наблюдаемый эффект [278].

3.4.5.2 Усиление цитотоксического эффекта ХПС *in vitro* при совместном применении с ингибитором аутофагии хлорохином

Для исследования роли аутофагии в процессе гибели клеток клетки аденокарциномы легкого А-549 и фибробласты легкого Wi-38 обрабатывали ХПС и сразу после обработки добавляли хлорохин – ингибитор последней стадии аутофагии. Оценивали жизнеспособность клеток после моно- и комбинированной обработки (Рисунок 38).

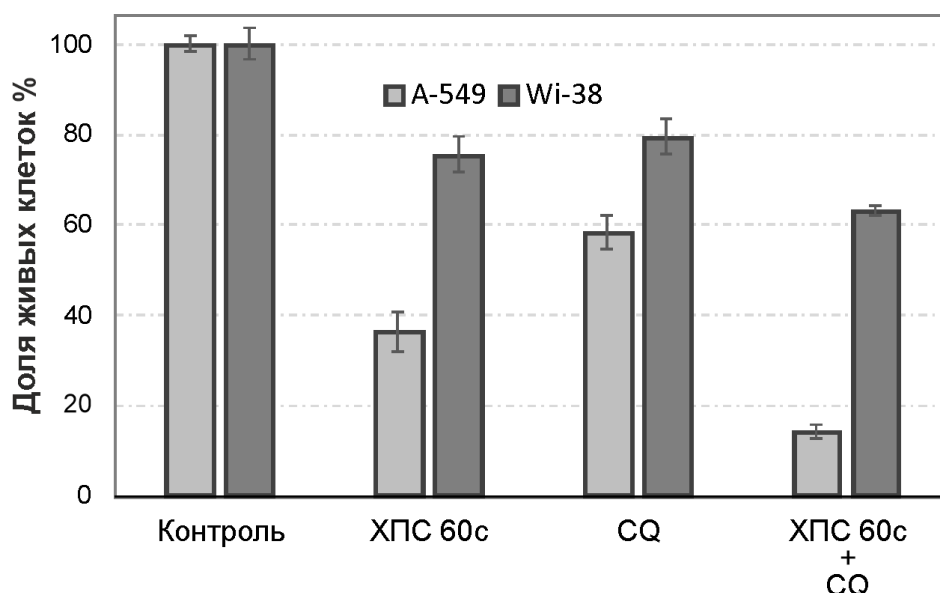


Рисунок 38 – Жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого А-549 и фибробластов легкого Wi-38 после обработки ХПС в комбинации с 20 мкМ хлорохином. Данные МТТ-теста через 24 ч после обработки. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение.

Добавление хлорохина после обработки ХПС приводит к усилению цитотоксического эффекта плазмы. Комбинаторный индекс составил 0,6, что позволяет говорить о синергическом действии двух факторов. Хлорохин блокирует последнюю стадию аутофагии – слияние аутофагосом с лизосомами [279]. Можно предположить, что наблюдаемый синергизм обусловлен также и усилением стресса ЭПР, так как для хлорохина описан такой механизм действия [280].

3.4.5.3 Изменение уровней белков-участников аутофагии в клетках после обработки ХПС

Для исследования активации аутофагии определяли в клетках после обработки ХПС относительные уровни белков-участников аутофагии методом вестерн-блота. Клетки аденокарциномы легкого А-549 и фибробласты легкого Wi-38 обрабатывали только ХПС в течение 1 мин либо ХПС в комбинации с хлорохином и через 6 и 24 ч оценивали уровень белков BECN1, p62, ATG5, LC3I/II, в качестве референсного белка использовали тубулин. При развитии аутофагии без добавления ингибиторов протеаз уровень белков, участвующих в сборке аутофагосомы, должен падать, поскольку также, как и содержимое, эти белки подвергаются протеолизу. Результаты анализа представлены: для клеток культуры А-549 – на рисунке 39, для Wi-38 – на рисунке 40.

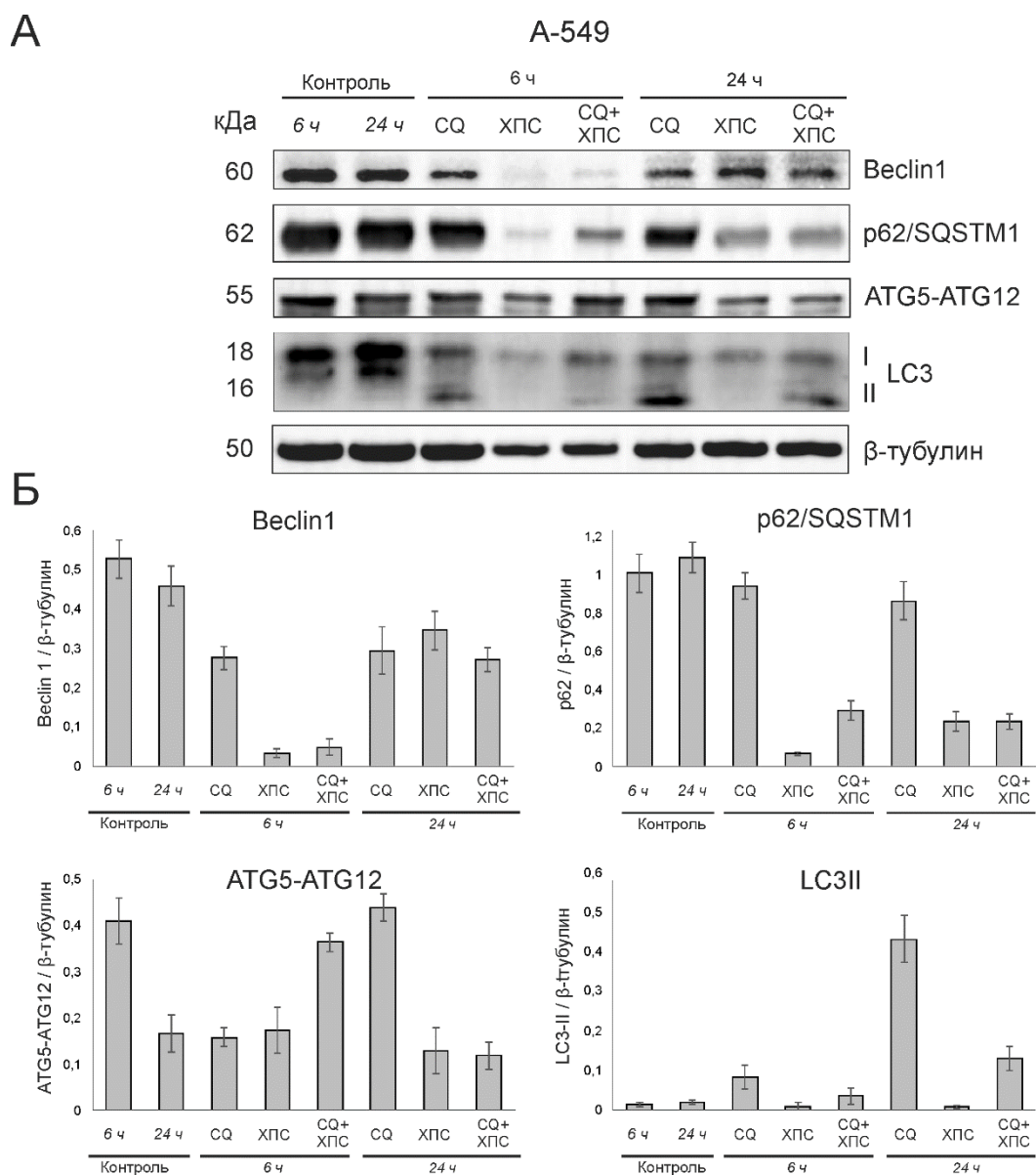


Рисунок 39 – Результаты анализа относительных уровней белков BECN1, p62, ATG5, LC3I/II методом вестерн-блота в клетках A-549 через 6 и 24 ч после обработки ХПС в течение 60 с. А – репрезентативные изображения вестерн-блота образцов клеток, Б – денситометрический анализ данных вестерн-блота. Данные представлены как среднее значение, рассчитанное по двум повторам $\pm$ стандартное отклонение, нормализация на уровень тубулина.

В клетках A-549 (Рисунок 39) через 6 часов после обработки ХПС наблюдается снижение белков BECN1 и ATG5. Также снижен p62, что характерно для продуктивной аутофагии. Что касается липидированной формы LC3II – она остается на базовом низком уровне, но дополнительно истощается пул LC3I. Такая динамика может свидетельствовать об активации аутофагии. При этом, добавление к ХПС-обработанным клеткам CQ к

частично подавляет снижение BECN1, ATG5 и p62, связанное с их деградацией в аутофаголизосомах.

Через 24 ч после обработки ХПС наблюдается увеличение клеточных BECN1, p62 и LC3II относительно точки бч, однако уровень белков остается пониженным относительно соответствующего контрольного образца. Можно заключить, что к 24 ч уровень ХПС-зависимой аутофагии в клетках значительно снижается.

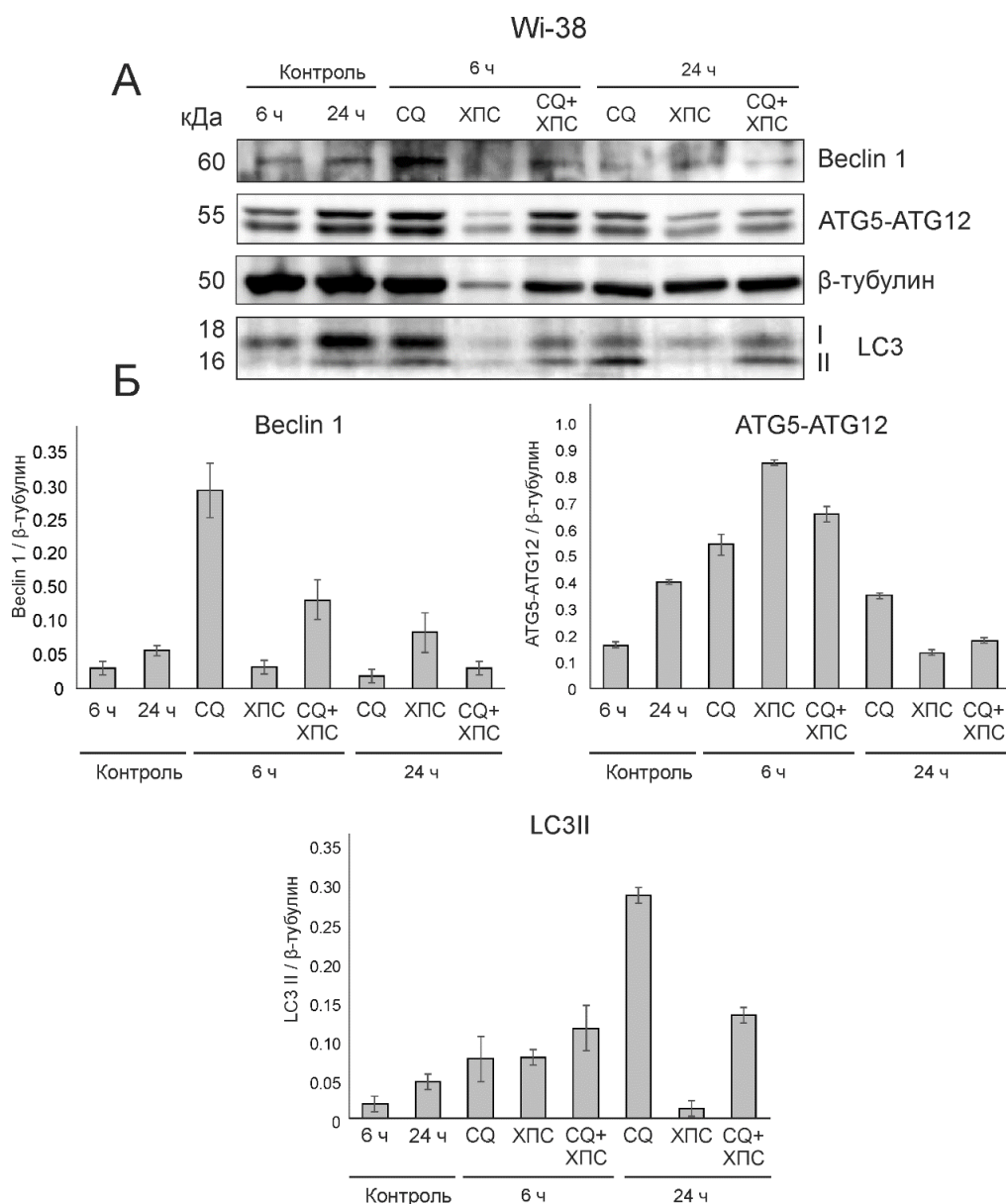


Рисунок 40 – Результаты анализа относительных уровней белков BECN1, ATG5, LC3I/II методом вестерн-блота в клетках Wi -38 через 6 и 24 ч после обработки ХПС в течение 60 с. А – репрезентативные изображения вестерн-блота образцов клеток, Б – денситометрический анализ данных вестерн-блота. Данные представлены как среднее значение, рассчитанное по двум повторам $\pm$ стандартное отклонение, нормализация на уровень тубулина.

В случае фибробластов легкого Wi-38 (Рисунок 40) через 6 часов после обработки ХПС наблюдается увеличение уровня ATG5 и процессированной формы LC3, а уровень BECN1 не изменяется. Наиболее вероятно, что активируются процессы транскрипции/трансляции этих генов, но продуктивная аутофагосома не собирается. Через 24 ч после обработки можно видеть снижение уровней ATG5 и процессированной формы LC3 относительно контроля, что может свидетельствовать о продолжении аутофагии.

Уровни белков BECN1, ATG5 и LC3II увеличиваются при инкубации клеток с хлорохином, что подтверждает ингибирование аутофагии. Комбинация обработки ХПС с хлорохином также, как и в случае с A-549, уменьшает эффекты продуктивной аутофагии.

Можно заключить, что индукция аутофагии в клетках A-549 является ранним ответом, а в клетках Wi-38 – поздним ответом. Стоит отметить, что исследованные белки могут участвовать и в других процессах, что может обуславливать регуляцию их уровней, независимую от аутофагии [281].

3.4.5.4 Изменение уровней белков контроля качества митохондрий PINK1 и DRP1 в клетках после обработки ХПС

Известно, что обработка клеток хлорохином может приводить к нарушениям функций митохондрий, в том числе к снижению интенсивности дыхания, повреждению митохондриальной ДНК, уменьшению концентраций интермедиатов цикла трикарбоновых кислот, а также уменьшению соотношения пирувата к лактату [282]. Для оценки качества митохондрий в клетках, обработанных ХПС, хлорохином и их комбинацией, исследовали уровень белков PINK1 и DRP1 (DNM1L) во фракции митохондрий через 6 и 24 ч после обработки. PINK1 – это киназа, регулирующая инициацию митофагии – процесса удаления поврежденных и дисфункциональных митохондрий [283]. DRP1 – ГТФаза, контролирующая деление митохондрий, которое часто связано с удалением поврежденных фрагментов в этих органеллах [284]. Уровень белков митохондриальной фракции нормировали на уровень цитохром С оксидазы (COX IV, COX4I1). Данные анализа представлены на рисунках 41 и 42.

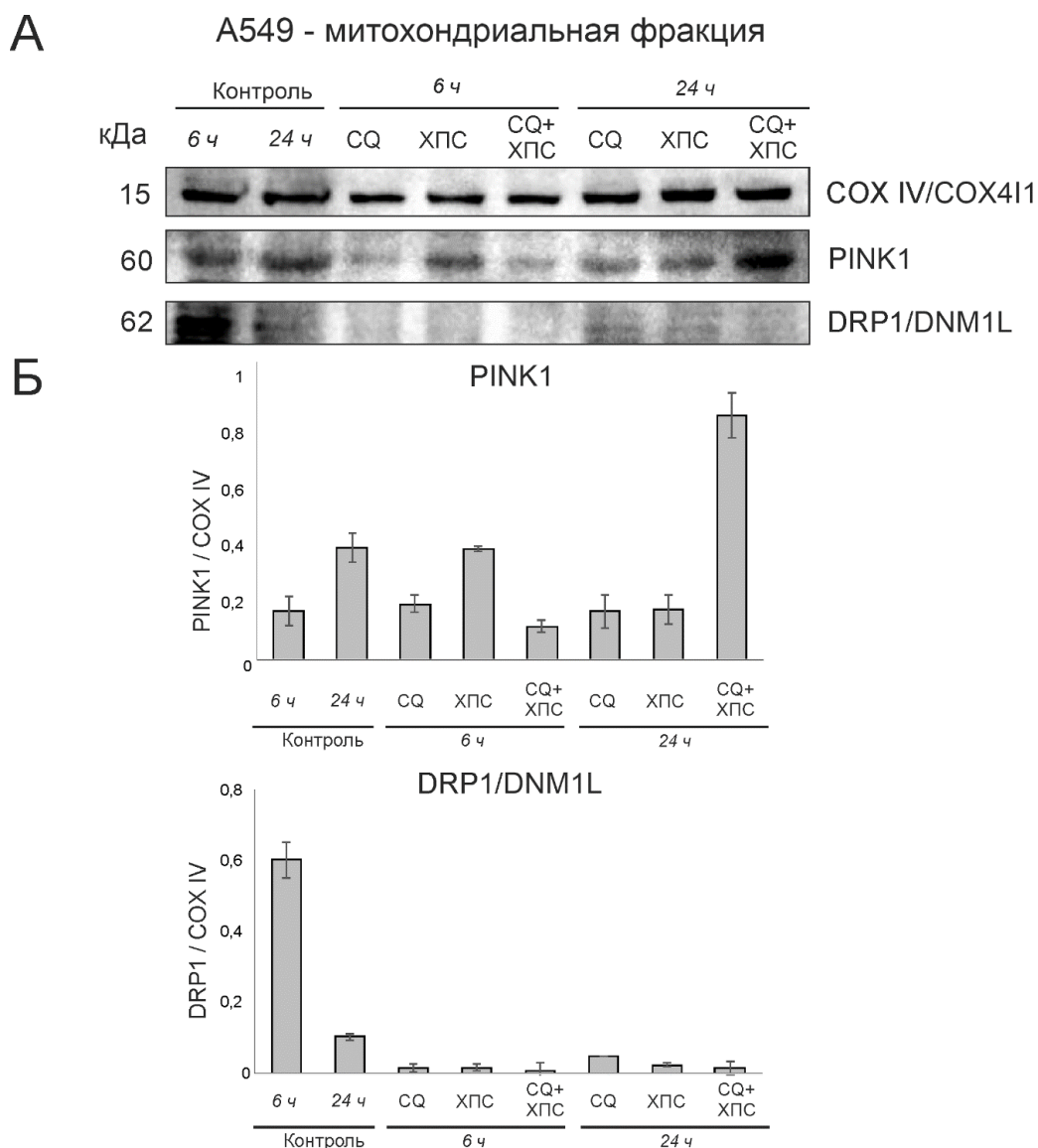


Рисунок 41 – Результаты анализа относительных уровней белков PINK1 и DRP1 в митохондриальной фракции клеток методом вестерн-блота в клетках А-549 через 6 и 24 ч после обработки ХПС в течение 60 с. А – репрезентативные изображения вестерн-блота образцов клеток, Б – денситометрический анализ данных вестерн-блота. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, нормализация на уровень цитохром С оксидазы COX IV.

Обработка ХПС опухолевых клеток (Рисунок 41) приводит к незначительному росту уровня PINK1 в митохондриальной фракции клеток через 6 часов, что может отражать индукцию митофагии в части клеток. В то же время снижение экспрессии DRP1 нарушает процесс деления митохондрий, препятствуя отделению поврежденных частей для деградации митофагией, что может вести к накоплению дисфункциональных митохондрий, увеличению уровней АФКА в клетке [285,286]. Через 24 ч после обработки уровни как

PINK1, так и DRP1 снижены относительно контроля, что также способствует накоплению поврежденных митохондрий. Обработка клеток хлорохином приводит к снижению уровня DRP1 через 6 часов. Через 24 ч уровни как PINK1, так и DRP1 остаются пониженными. Совместная обработка ХПС и хлорохином стимулирует накопление PINK1 через 24 ч после обработки, DRP1 остается сниженным как через 6, так и через 24 часа, что указывает на возможное накопление поврежденных митохондрий через 24 ч.

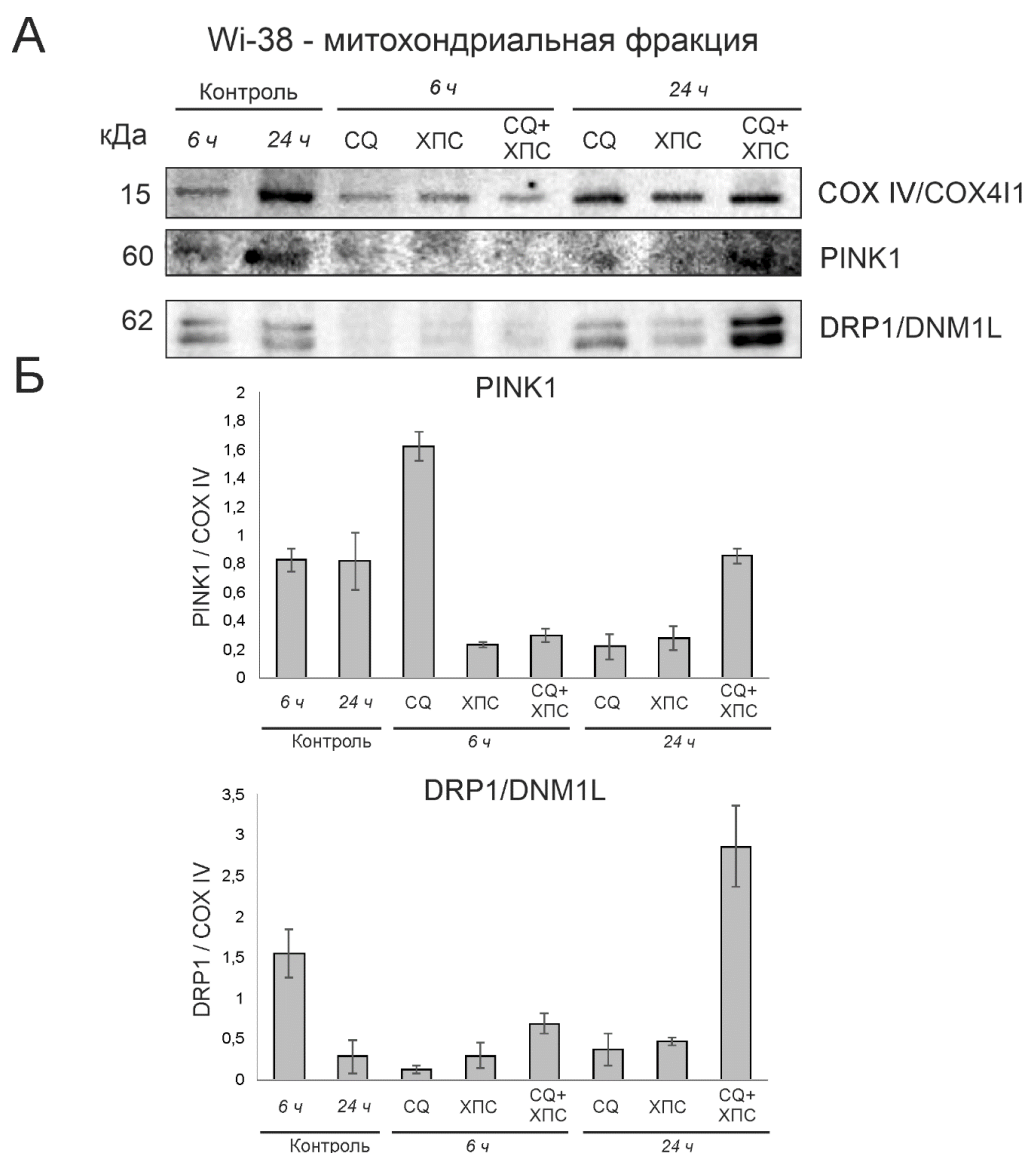


Рисунок 42 – Результаты анализа относительных уровней белков PINK1 и DRP1 в митохондриальной фракции клеток методом вестерн-блота в клетках А-549 через 6 и 24 ч после обработки ХПС в течение 60 с. А – репрезентативные изображения вестерн-блота образцов клеток, Б – денситометрический анализ данных вестерн-блота. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, нормализация на уровень цитохром С оксидазы COX IV.

В митохондриальной фракции фибробластов легкого через 6 часов после обработки ХПС (Рисунок 42) наблюдаются сниженные уровни как PINK1, так и DRP1, что свидетельствует об ограниченном делении митохондрий. Известно, что ограничение деления митохондрий позволяет клеткам преодолевать состояние стресса и оптимизировать генерацию энергии в этих органеллах [287]. К 24 часам уровень PINK1 остается пониженным, уровень DRP1 приходит к уровню соответствующего контроля. Хлорохин может стимулировать накопление поврежденных митохондрий, так как индуцирует накопление PINK1 и снижение уровня DRP1 через 6 часов. При этом к 24 часам уровень PINK1 меньше базового уровня, а уровень DRP1 приходит к уровню контроля. Совместная обработка ХПС и хлорохином снижает уровни как PINK1, так и DRP1 через 6 часов после обработки, через 24 ч уровень PINK1 достигает контрольного уровня, а уровень DRP1 оказывается повышенным, что может свидетельствовать о стимуляции деления митохондрий.

По данным, полученным в рамках данной работы, можно сделать вывод, что обработка ХПС приводит к индукции аутофагии в обработанных клетках. Вероятно, аутофагия активируется как путь, способствующий выживанию клеток в условиях накопления поврежденных биомолекул. При этом добавление хлорохина – ингибитора последних стадий аутофагии – усиливает цитотоксическое действие ХПС, что может быть обусловлено неспособностью клетки к завершению аутофагии, повреждением митохондрий под действием этого препарата, а также усилением стресса ЭПР [272].

3.4.6 Индукции апоптоза в ответ на обработку клеток ХПС

Апоптоз, а именно внутренний, или митохондриальный, его тип является наиболее вероятным типом гибели клеток после обработки ХПС, так как апоптоз инициируется при обширном повреждении биомолекул, в том числе и геномной ДНК, и органелл. Индукция сигнальных путей, вовлеченных в регуляцию апоптоза, была показана выше, при описании анализа транскриптомов обработанных клеток.

3.4.6.1 Транслокация фосфатидилсерина на поверхность клеток, обработанных ХПС

Для подтверждения данных транскриптомного анализа по индукции апоптоза клетки аденокарциномы легкого А-549 и фибробласты легкого Wi-38 обрабатывали ХПС и через

24 ч после обработки окрашивали аннексином V, конъюгированным с изотиоцианатом флуоресцеина, и йодидом пропидия (PI). Аннексин V связывается с фосфатидилсерином, который в норме присутствует только на внутренней стороне мембраны клетки, но претерпевает транслокацию на внешний слой мембраны клетки в ходе ранних стадий апоптоза, таким образом, клетки, находящиеся на ранних стадиях этого процесса, будут иметь высокую интенсивность флуоресценции в канале FITC. Йодид пропидия проникает в клетку только в случае поврежденной мембраны клеток и интеркалирует в ДНК. Таким образом, клетки с поврежденной мембраной, то есть клетки, находящиеся в состоянии позднего апоптоза либо гибели с морфотипом некроза, будут обладать высокой интенсивностью флуоресценции как в канале FITC, так и в канале PE. Использовали предобработку ингибитором каспаз Z-VAD для ингибирования этих ферментов. Результаты проточной цитофлуориметрии обработанных клеток представлены на рисунке 43.

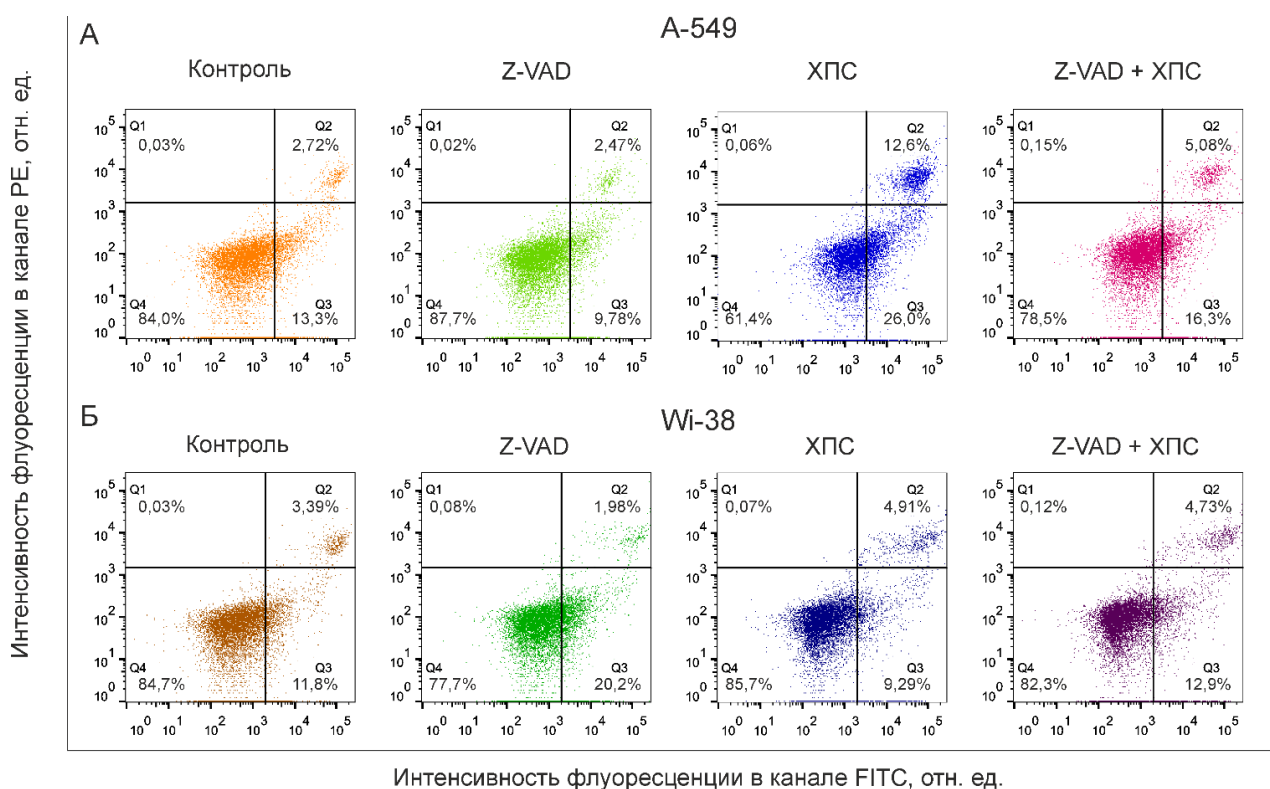


Рисунок 43 – Анализ доли клеток A-549 (А) и Wi-38 (Б) в состоянии апоптоза и позднего апоптоза/некроза через 24 ч после обработки ХПС в течение 1 мин. Представлены репрезентативные результаты цитофлуориметрического анализа образцов клеток. Ингибитор каспаз Z-VAD добавляли к клеткам за 2 ч до обработки ХПС до конечной концентрации 30 мкМ.

Из данных, приведенных на рисунке 43 видно, что обработка ХПС приводит к увеличению доли клеток в состоянии как раннего апоптоза (клетки, положительные только по аннексину V – FITC), так и позднего апоптоза и некроза (клетки, положительные как по аннексину V – FITC, так и по PI). Предобработка Z-VAD частично ослабляет этот эффект, что позволяет предположить, что гибель клеток после воздействия ХПС зависит от каспаз.

Аналогичный эксперимент проводили на опухолевых клетках А-549 через 6 часов после обработки ХПС (Рисунок 44). Клетки обрабатывали разными дозами плазмы: 30с, 60с, 120с.

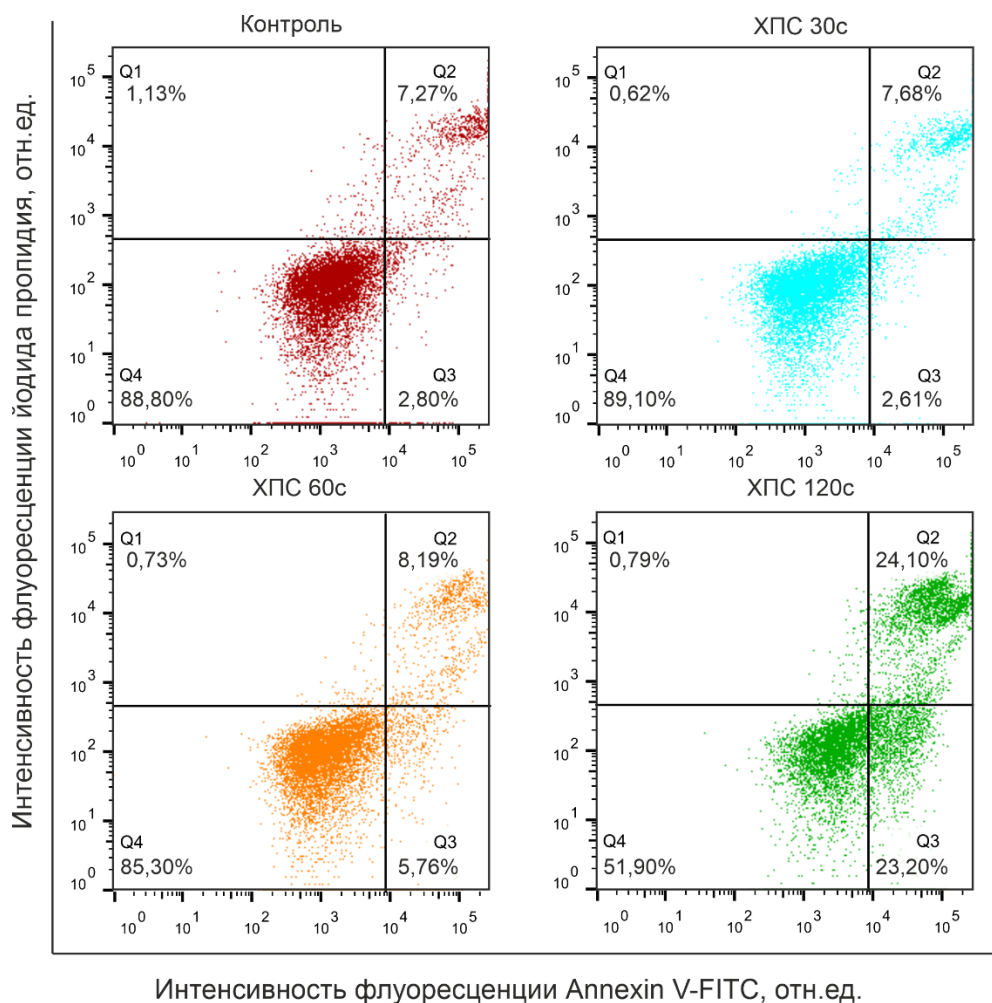


Рисунок 44 – Анализ доли клеток А-549 в состоянии раннего апоптоза и позднего апоптоза/некроза через 6 часов после обработки ХПС в течение 30, 60, 120с. Представлены репрезентативные результаты цитофлуориметрического анализа образцов клеток.

Было показано, что через 6 часов после обработки количество клеток в состоянии раннего апоптоза невелико. Происходит дозозависимое увеличение доли клеток в состоянии позднего апоптоза/некроза. Длительная обработка в течение 120с приводит к

быстрой гибели клеток, вызывая увеличение сигнала как от клеток, окрашенных только аннексином V, так и клеток, окрашенных обоими красителями.

3.4.6.2 Активация эффекторных каспаз 3 и 7 в ответ на обработку клеток ХПС

Характерной чертой гибели клеток по пути апоптоза является активация эффекторных каспаз-3 и -7. Для оценки активации каспаз-3 и -7 после обработки ХПС клетки А-549 обрабатывали плазмой и через 4 и 8 часов после обработки добавляли реагент CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent, представляющий собой ДНК-интеркалирующий краситель, конъюгированный с пептидом DEVD. Активные каспазы катализируют гидролиз пептидной связи после С-концевого аспартата, высвобождая краситель, который проникает в ядро клетки и связывается с ДНК. Флуоресценция красителя имеет максимумы поглощения/флуоресценции в районе 502/530 нм и детектируется в канале FITC. Результаты анализа методом проточной цитофлуориметрии представлены на рисунке 45.

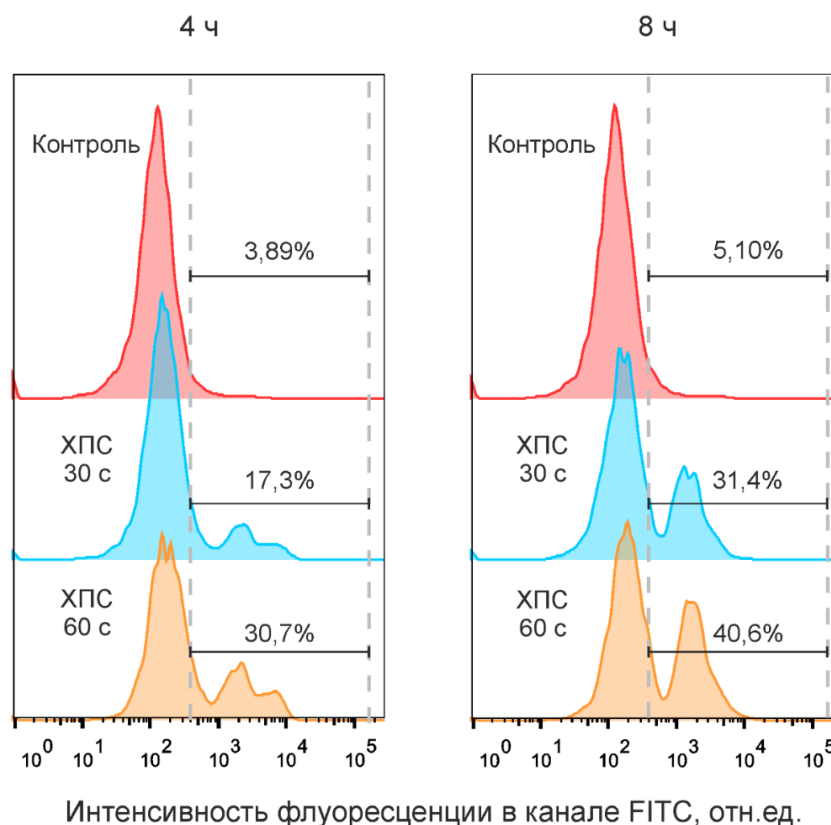


Рисунок 45 – Активность каспаз 3 и 7 в клетках А-549 через 4 и 8 часов после обработки ХПС в течение 30с и 60с. Репрезентативные результаты цитофлуориметрического анализа клеток, инкубированных с реагентом CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent.

Обработка ХПС приводит к дозозависимому увеличению клеток с активными каспазами 3 и 7. Причем доля таких клеток увеличивается к 8 часам после обработки.

3.4.6.3 Деполяризация митохондрий клеток после обработки ХПС

Сигнальные каскады апоптоза приводят к деполяризации митохондрий за счет образования пор в митохондриях и выхода из этих органелл ионов. Широко применяемым индикатором потенциала митохондрий является краситель JC-1, который проникает в клетки и в митохондрии. В мономерной форме в цитоплазме и деполяризованных митохондриях флуоресцирует с максимум испускания при длине волны 529 нм. В intactных митохондриях JC-1 формирует так называемые J-агрегаты и флуоресцирует с максимумом испускания при 590 нм. Клетки А-549 обрабатывали ХПС в течение 30 и 60 с, через 6 и 24 ч после обработки окрашивали JC-1 и анализировали методом проточной цитофлуориметрии (Рисунок 46).

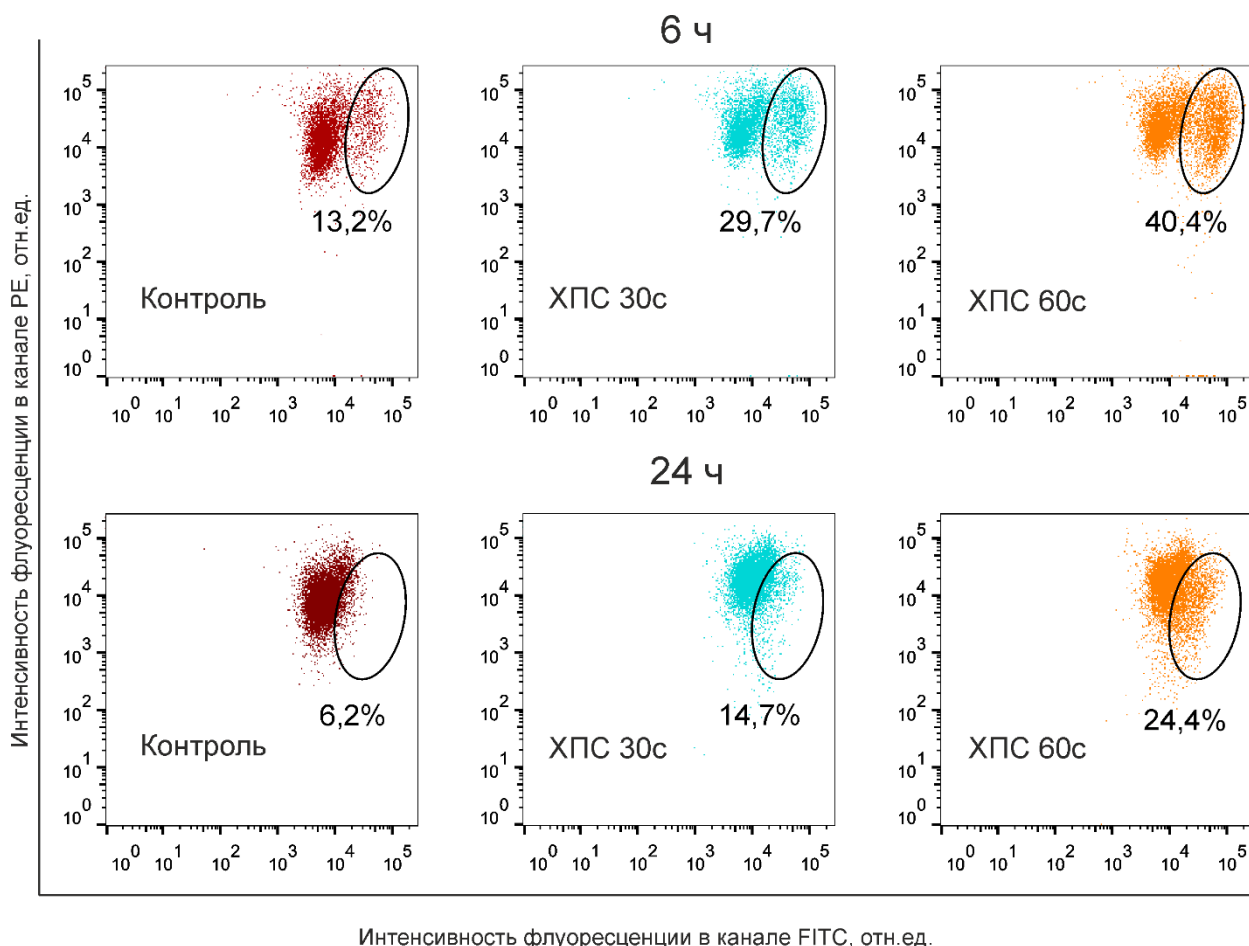


Рисунок 46 – Анализ деполяризации митохондрий клеток А-549 через 6 и 24 ч после обработки ХПС в течение 30 или 60 с. Репрезентативные результаты проточной цитофлуориметрии клеток, инкубированных с красителем JC-1.

Можно видеть, что в контрольных клетках большая часть клеток содержат как агрегаты, так и свободный JC-1 и характеризуются интенсивной флуоресценцией в обоих каналах. Через 6 часов после обработки ХПС в течение 30 и 60 с, по-видимому, начинается разрушение агрегатов за счет деполяризации части митохондрий – можно наблюдать клетки, в которых растет зеленая флуоресценция, соответствующая мономерам JC-1, причем этот процесс зависит от дозы ХПС. В образцах клеток через 24 ч наблюдается такая же тенденция, однако доля клеток с деполяризованными митохондриями меньше, что может быть вызвано исключением из анализа клеточного дебриса, в который переходят клетки в поздней стадии гибели.

Из представленных данных можно сделать вывод, что в клетках после обработки ХПС запускается гибель по пути апоптоза, о чем свидетельствуют активация соответствующих сигнальных путей, транслокация фосфатидилсерина на поверхность клеток, активация каспаз 3 и 7, а также деполяризация митохондрий. Полученные данные согласуются с опубликованными данными. Такие же эффекты были показаны другими исследователями на клетках остеосаркомы [288], меланомы [289], клетках рака головы и шеи [290].

3.4.7 Изменение экспрессии гена глутатионпероксидазы 4 и содержания белка GPX4 в ответ на обработку ХПС в опухолевых и здоровых клетках легкого человека

Глутатионпероксидазы представляют собой один из основных классов ферментов, вовлеченных в нейтрализацию АФКА в клетке. Экспрессия генов глутатионпероксидаз регулируется большим количеством транскрипционных факторов, среди которых присутствуют факторы семейства C/EBP, AP1, CREB, NF-κB [291], активация которых была показана при описании анализа транскриптома обработанных клеток.

Глутатионпероксидаза 4 играет ключевую роль в элиминации пероксида водорода, органических пероксидов, в том числе липидов, подвергшихся перекисному окислению, тем самым ингибируя ферроптоз [292].

Клетки аденокарциномы легкого А-549, а также фибробласты легкого обрабатывали ХПС и через 3 и 24 ч проводили лизис клеток, оценивали уровень мРНК *GPX4* методом ОТ-ПЦР РВ (Рисунок 47).

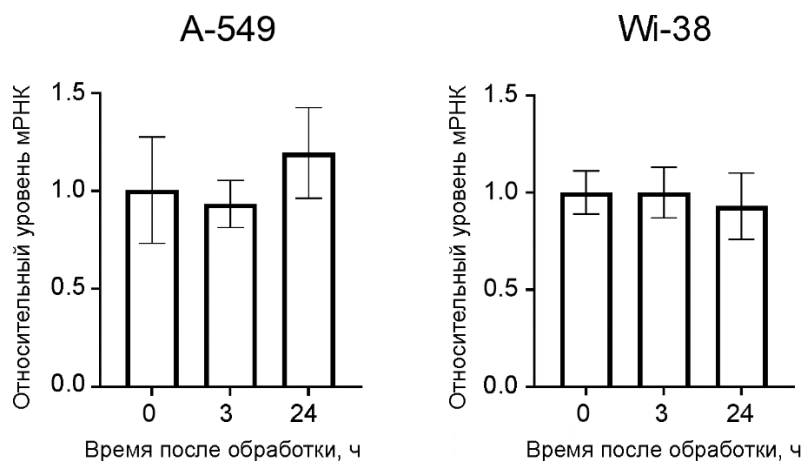


Рисунок 47 – Экспрессия гена *GPX4* в клетках A-549 и Wi-38 через 3 и 24 ч после обработки ХПС. Данные анализа методом ОТ-ПЦР РВ, проведенного через 3 и 24 ч после обработки. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Статистическая значимость обозначена как $*p \leq 0.05$ относительно контрольного образца, тест Манна-Уитни.

В результате анализа не было выявлено достоверных отличий экспрессии гена глутатионпероксидазы 4 в выбранных клетках после обработки ХПС.

Оценку экспрессии гена глутатионпероксидазы 4 на уровне белка оценивали методом вестерн-блота через 3 и 24 ч после обработки ХПС (Рисунок 48). Использовали клеточные линии аденокарциномы легкого человека A-549 и NCI-H23, а также фибробласты легкого Wi-38.

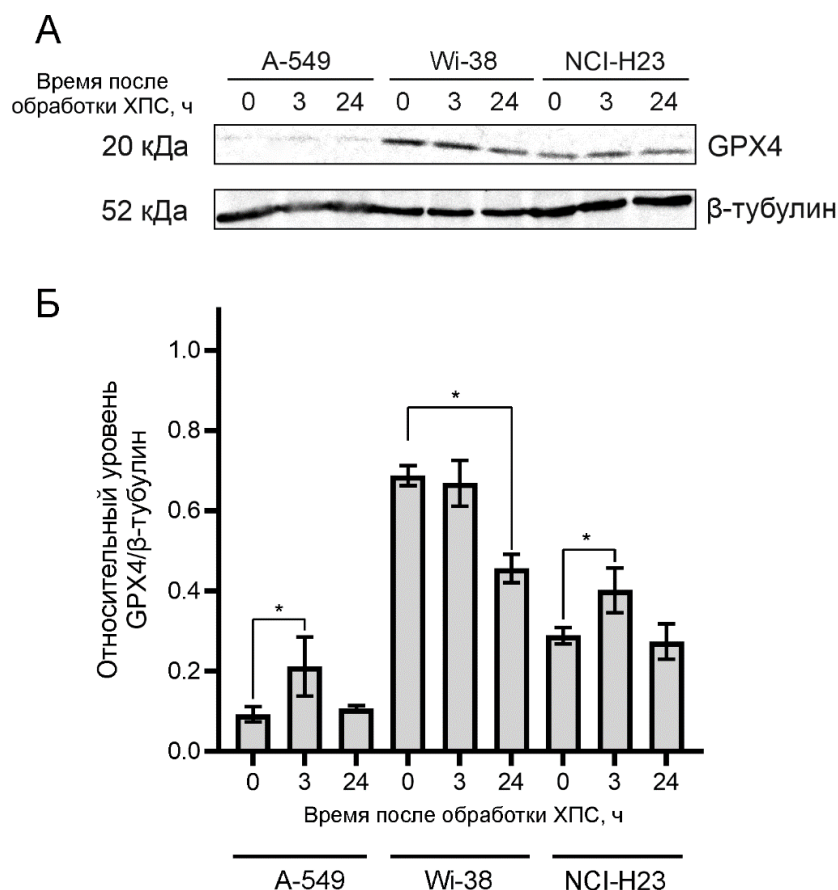


Рисунок 48 – Результаты анализа относительных уровней белка GPX4 методом вестерн-блота в клетках A-549, Wi-38, NCI-H23 через 3 и 24 ч после обработки ХПС в течение 60 с. А – репрезентативные изображения вестерн-блота образцов клеток, Б – денситометрический анализ данных вестерн-блота. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, нормализация на уровень тубулина.

Можно видеть, что в опухолевых клетках A-549 и NCI-H23 наблюдается одинаковая тенденция к увеличению уровня GPX4 через 3 ч после обработки ХПС и возвращение его к уровню в необработанных клетках через 24 ч после обработки. При этом клетки A-549 характеризуются низким базовым уровнем белка GPX4. В фибробластах легкого базовый уровень GPX4 выше, чем в A-549 и NCI-H23. Через 3 ч после обработки уровень не изменяется, а к 24 часам после обработки ХПС – снижается. Интересно, что в выбранных опухолевых клетках наблюдается высокая экспрессия мРНК *GPX4* (по данным транскриптомного анализа и ОТ-ПЦР для A-549 и по данным портала Human Protein Atlas [293]). При этом базовый уровень белка остается на низком уровне. В литературе нет данных о причинах такого эффекта. Отмечается, что трансляция этой мРНК регулируется доступностью селена [294], а также цистина [295]. Известно также, что трансляция мРНК *GPX4* активируется при связывании белка IGF2BP3 N⁶-метиладенозина в определенных позициях последовательности [296]. Кроме того, в клетках может стимулироваться

деградация этого белка. Так, известно, что пальмитоилирование Cys66 повышает стабильность GPX4 [297].

Как было отмечено выше, глутатионпероксидаза 4 играет важную роль в защите клетки от перекисно-окисленных липидов. Дефицит этого белка в клетках A-549 может способствовать накоплению поврежденных липидов, которое было показано в пп. 3.2.2, и индукции гибели клетки по пути ферроптоза. При этом исследования последних лет показывают, что существует тесная связь между сигнальными путями апоптоза и ферроптоза, хотя подробности этого взаимодействия остаются неизвестными [298]. Предполагается, что «выбор» типа гибели определяется как природой инициирующего фактора, так и активностью ферментов, устраняющих перекисные повреждения липидов, степенью повреждения липидов, активностью каспаз и других проапоптотических белков [препринт, 260].

3.6 Исследование противоопухолевой эффективности ХПС *in vivo*

3.6.1 Оптимизация параметров ХПС для применения *in vivo*

Несмотря на неравновесный характер плазмы, длительное воздействие – 2 мин и более – приводит к нагреву обрабатываемого объекта до температур выше 40°C, что в случае обработки животных недопустимо, так как, во-первых, может приводить к ожогам кожи, а, во-вторых, не позволит при изучении механизма выделить вклад ХПС в биологический эффект. Сотрудниками ИТПМ СО РАН и ИФП СО РАН был предложен режим генерации ХПС, позволяющий снизить нагрев мишени при длительной обработке [300]. В этом режиме вместо широко используемого синусоидального характера напряжения используется импульсный с однополярными положительными импульсами продолжительностью 7 мкс. Для проверки цитотоксического эффекта нового режима оценивали жизнеспособность клеток A-549 методом МТТ-теста через 24 ч после обработки, а также экспрессию гена GADD45B через 3 и 24 ч после обработки ХПС в течение 1 мин (Рисунок 49).

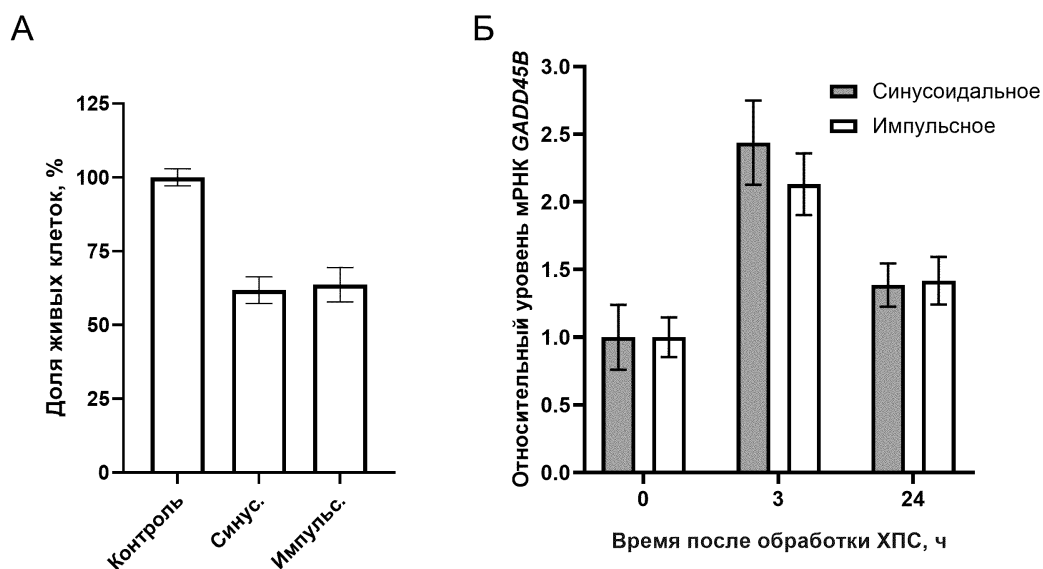


Рисунок 49 – Сравнение импульсного и синусоидального режимов генерации ХПС на клетках аденокарциномы легкого А-549. А – результаты оценки жизнеспособности клеток методом МТТ-теста через 24 ч после обработки. «Синус.» - синусоидальное напряжение, «Импульс.» - импульсное напряжение. Б – оценка экспрессии гена *GADD45B* в образцах клеток через 3 и 24 ч после обработки ХПС. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение.

Можно видеть, что обработка клеток в импульсном режиме обладает схожим цитотоксическим эффектом с синусоидальным режимом (Рисунок 49А). Кроме того, характер изменения экспрессии гена *GADD45B* в клетках, обработанных ХПС в обоих режимах, схож для исследуемых режимов (Рисунок 49Б). Учитывая данные по изменению температуры поверхности обрабатываемой мишени [300] можно сделать вывод о предпочтительности использования импульсного типа напряжения генерации ХПС для обработки экспериментальных животных.

3.6.2 Оценка цитотоксической активности ХПС в отношении клеток меланомы мыши В16

Для оценки противоопухолевой эффективности ХПС *in vivo* в качестве сингенной модели были выбраны мыши линии С57BL/6 с трансплантированными подкожно клетками меланомы мыши В16.

Для оценки жизнеспособности клеток меланомы мыши В16 после обработки ХПС использовали два подхода: анализ пролиферации клеток в режиме реального времени, для

которого клетки обрабатывали при помощи синусоидального напряжения, и МТТ-тест, при этом для обработки использовали импульсное напряжение (Рисунок 50).

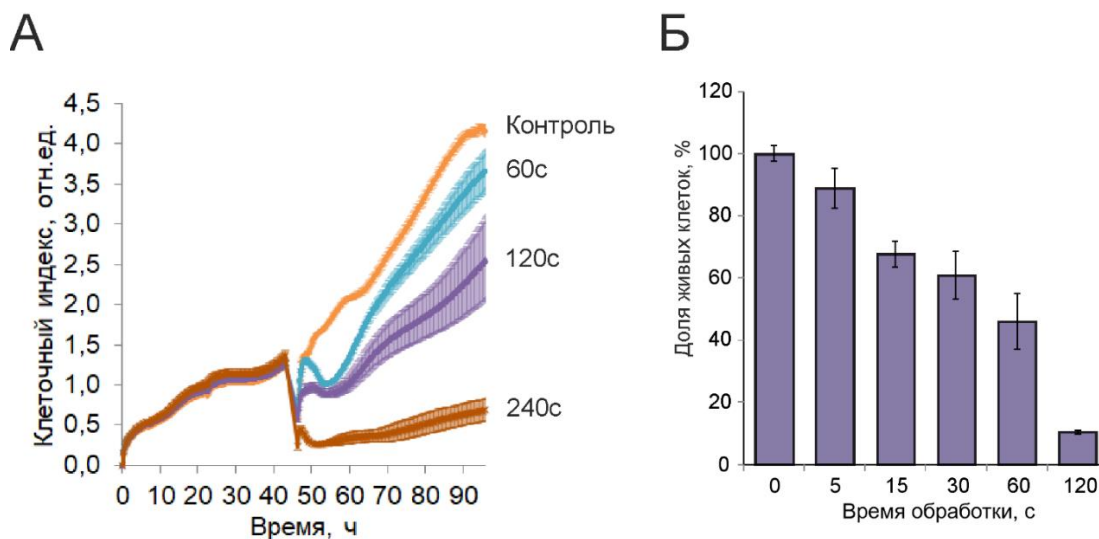


Рисунок 50 – Анализ жизнеспособности клеток меланомы мыши В16 после обработки ХПС. А – результаты анализа пролиферации клеток в режиме реального времени при помощи клеточного анализатора iCELLigence, синусоидальный тип напряжения. Б – результаты МТТ-теста, проведенного через 24 ч после обработки ХПС в импульсном режиме. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение.

Видно, что при обработке клеток ХПС в течение 60 с в импульсном режиме наблюдается более активная гибель, тогда как обработка в синусоидальном режиме лишь незначительно тормозит пролиферацию клеток. Можно заключить, что ХПС в импульсном режиме оказывает больший цитотоксический эффект на клетки меланомы мыши В16.

3.6.3 Противоопухолевое действие ХПС при применении на мышах-опухоленосителях

При переходе к экспериментам на животных важным контролируемым параметром был нагрев биомишени в области воздействия. Для определения безопасных параметров воздействия ХПС использовали здоровых мышей линии С57BL/6. Мы определили, что при обработке ХПС, генерируемой в импульсном режиме с напряжением 4,2 кВ, частотой 30 кГц, продолжительностью импульсов 7 мкс и скоростью гелия 9 л/мин, температура области обработки ХПС увеличивалась в течение первой минуты обработки с 33 °С до 37 °С и далее оставалась постоянной. Результат измерения температуры области обработки после 1 мин можно видеть на рисунке 51.

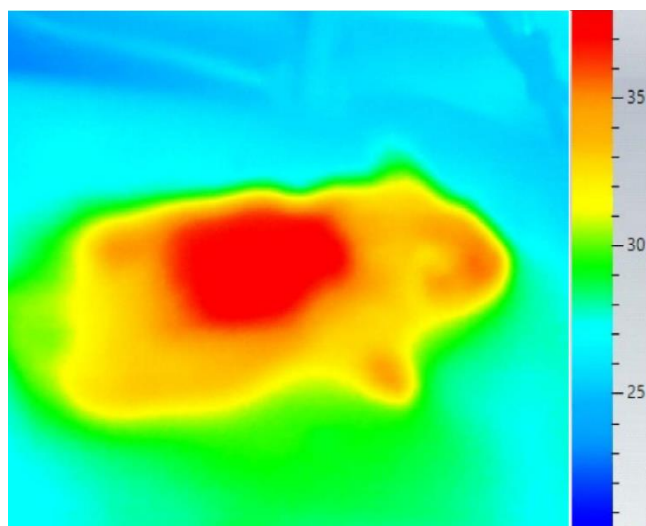


Рисунок 51 – Температура кожи мыши C57BL/6 через 1 мин обработки ХПС. Данные получены сотрудниками Института физики полупроводников СО РАН д.ф.-м.н. Закревским Д.Э. и Милахиной Е.В.

Можно видеть, что обработка ХПС приводит к локальному нагреву поверхности кожи до 37-38 градусов в месте обработки, что позволяет проводить обработку *in vivo* без риска термического ожога и термического воздействия на опухолевый клетки.

Для оценки противоопухолевой эффективности ХПС *in vivo* мышам линии C57BL/6 трансплантировали подкожно клетки В16. По достижении опухолями размера 40 мм³ распределяли животных по 3 экспериментальным группам (Таблица 12) и проводили терапию по схеме, представленной на рисунке 52.

Таблица 12 – Экспериментальные группы и схема терапии животных

Группа	Количество животных	Схема терапии
Контроль	5	Животные получали 400 мкл раствора Рингера внутривбрюшинно.
ХПС	6	Опухоли животных обрабатывали ХПС в течение 2 мин.
ХПС+CQ	6	Животным вводили внутривбрюшинно 300 мкл раствора хлорохина в дозе 50 мг/кг, через 1 час обрабатывали опухоли ХПС.

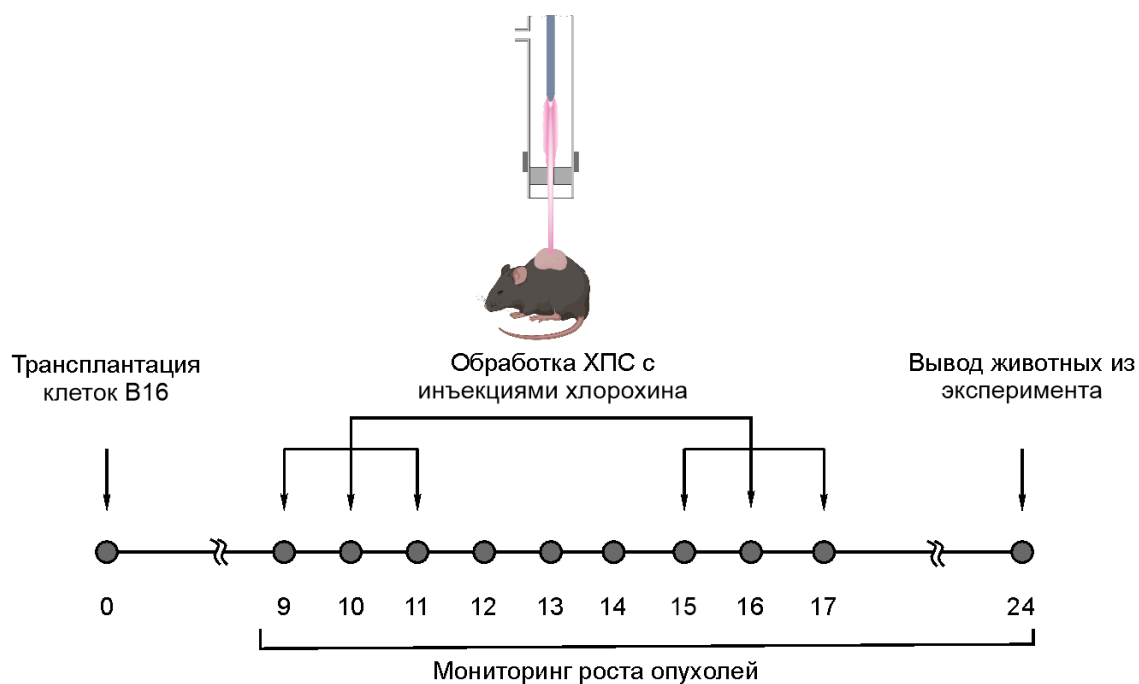


Рисунок 52 – Схема эксперимента по оценке противоопухолевой эффективности ХПС *in vivo*.

Проводили мониторинг роста опухолей и веса мышей, эксперимент продолжали до достижения отдельными опухолями объема 2000 мм³. Животных выводили из эксперимента, извлекали селезенку, печень, оценивали массу этих органов. Результаты эксперимента представлены на рисунке 53.

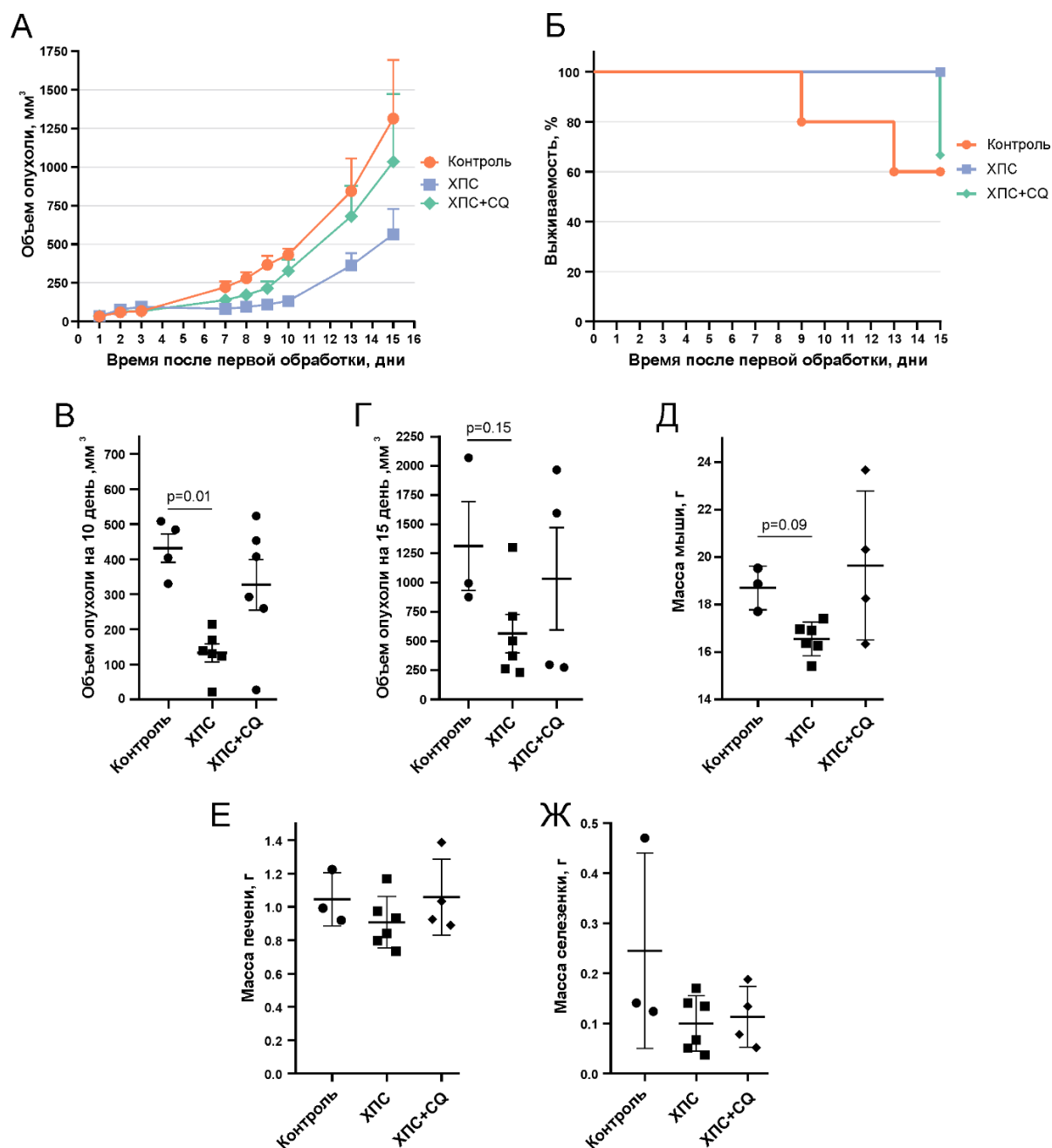


Рисунок 53 – Результаты оценки противоопухолевой эффективности ХПС *in vivo* на мышах линии C57BL/6 с трансплантированными подкожно клетками меланомы мыши В16. А – динамика объемов опухолей животных. Б – выживаемость животных в экспериментальных группах. В – объемы опухолей на 10 день после первой обработки ХПС. Г - объемы опухолей на 15 день после первой обработки ХПС. Д – масса мышей на 15 день после первой обработки ХПС. Е – масса печени. Ж – масса селезенки. Уровни значимости (p) рассчитаны с использованием критерия Краскела-Уоллиса с поправкой на множественные сравнения, сравнение экспериментальных групп относительно контрольной группы.

Можно видеть, что обработка ХПС позволяет достичь значительного торможения роста опухоли ($p=0.01$) по сравнению с контрольной группой, индекс торможения роста

опухоли составляет 69,2% на 10 день после первой обработки ХПС (Рисунок 49В). Индекс торможения роста опухоли на 15 день после начала обработки составил 57,1% (Рисунок 49Г). Применение комбинации ХПС с хлорохином не оказывало достоверного эффекта на рост опухоли (Рисунок 53А, В). При этом в группе ХПС к концу эксперимента были живы все мыши, тогда как в контрольной группе и в группе комбинации ХПС с хлорохином умерли по 2 мыши (Рисунок 53Б). Масса мышей в группе ХПС была ниже ($p=0,09$), чем в контрольной группе (Рисунок 53Д), что может быть свидетельством потенциальных системных побочных эффектов ХПС. Массы органов животных не отличались от значений в контрольной группе (Рисунок 53Е, Ж).

Таким образом, показана противоопухолевая эффективность ХПС в импульсном режиме *in vivo* на модели мышей С57ВL/6 с трансплантированными подкожно клетками меланомы мыши В16. ХПС повышает выживаемость животных, однако, возможно, приводит к системным побочным эффектам, что выражается в снижении веса мышей. Для дальнейшего использования ХПС в экспериментах *in vivo* следует снижать дозу воздействия за счет подбора параметров генерации, а также использовать препараты-партнеры для усиления противоопухолевого действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено комплексное исследование процессов, происходящих в клетке при прямой обработке струей холодной плазмы в гелии для разработки методов воздействия на злокачественные новообразования. Показано, что при обработке опухолевых и здоровых клеток легкого человека в течение 60 с ХПС, генерируемой с синусоидальным напряжением с амплитудой $U = 3,5$ кВ и частотой $f = 52$ кГц, скоростью гелия 9 л/мин, возможно добиться селективной гибели опухолевых клеток. Это важно, поскольку *in vivo* опухоли находятся в окружении здоровых тканей, повреждающее воздействие на которые должно быть минимальным.

Впервые исследована динамика уровней внеклеточных и внутриклеточных активных форм кислорода и азота после воздействия ХПС на моделях опухолевых и здоровых клеток. Колебания внеклеточных и внутриклеточных активных форм кислорода и азота позволяют выделить стадии детекции первичных (короткоживущих) генерируемых в потоке плазмы и переходящих в растворимую форму АФКА, и вторичных, т.е. образующихся при взаимодействии первичных АФКА с компонентами культуральной среды, другими АФКА и молекулами клеток. Показано, что повышенное содержание АФКА в клетках и культуральной среде, и, соответственно, нахождение в состоянии окислительного стресса, дольше сохраняется в опухолевых клетках. Полученные результаты подтверждают селективность выбранного режима облучения ХПС по отношению к опухолевым клеткам.

В работе проведено сравнение изменения транскриптомов опухолевых и здоровых клеток после обработки ХПС как на раннем этапе ответа (3 часа), так и на более позднем этапе (24 часа). Предполагалось, что ранний транскрипционный ответ может быть направлен на преодоление окислительного стресса в клетках, а поздний ответ направлен на регуляцию гибели и выживания клеток. Было показано, что обработка ХПС на ранних стадиях ответа приводит к активации аналогичных генов-регуляторов в опухолевых и здоровых клетках, прежде всего находящихся под контролем транскрипционных факторов NRF2, AP-1 и p53. Высвобождение NRF2 из комплекса с белком KEAP1, активирует транскрипцию генов, продукты которых преимущественно обеспечивают нейтрализацию АФКА и поврежденных биомолекул в цитоплазме. Компоненты комплекса AP-1 регулируют экспрессию широкого спектра генов, участвующих в прогрессии клеточного цикла, пролиферации, программируемой гибели клеток. Активация фактора p53 на раннем этапе, вероятнее всего, связана с повреждением геномной ДНК клетки. Стоит отметить, что уровень транскрипционного ответа в опухолевых клетках был выше, чем в здоровых

клетках. Данные транскриптомного анализа были подтверждены методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени для ключевых генов. Ранее в ряде работ для опухолевых клеток уже была показана активация транскрипции генов *FOS* и *GADD45A/B* после облучения ХПС, однако различие такой активации со здоровыми клетками в данной работе показано впервые. Более того, ранняя активация транскрипционного фактора NRF2 в опухолевых клетках в ответ на облучение ХПС, показана впервые. Характерным отличием опухолевых клеток была активация экспрессии генов, вовлеченных в ответ на стресс эндоплазматического ретикулума: на раннем этапе ответа – гена *ATF4*, на более позднем – гена *DDIT3* (*CHOP*). Кроме того, показана слабо выраженная индукция генов, связанных с аутофагией в ответ на обработку. Слабая индукция аутофагии является логичным следствием АФКА-зависимого окисления белка KEAP1, который в комплексе с убиквитин-лигазой Cul3 взаимодействует с белком-адаптором p62 и стимулирует сборку аутофагосомы.

Транскрипционный ответ на позднем этапе включал активацию генов путей p53 и NF-kB, определяющих жизнеспособность клетки и прогрессию клеточного цикла.

Результаты исследования транскриптома клеток позволили выявить ключевые процессы, изменение регуляции которых происходило под действием ХПС в клетках, что было далее верифицировано другими молекулярно-биологическими и физико-химическими методами. Были показаны накопление и репарация повреждений ДНК, стресс ЭПР, накопление повреждений липидов мембран, характерные для апоптоза деполяризация митохондрий, активация эффекторных каспаз 3/7. Ранее в работах нашей группы была показана транслокация кальретикулина (CRT) на поверхность опухолевых клеток после обработки ХПС, что также может быть косвенным подтверждением стресса ЭПР. Сравнивая направленность и амплитуду ХПС-индуцированных изменений в опухолевых и здоровых клетках можно заключить, что различия в метаболизме этих клеток, обусловленные в том числе мутационной нагрузкой, позволяют здоровым клеткам переживать ХПС-индуцированный окислительный стресс.

Результаты, полученные в данной работе, позволяют построить схему процессов, происходящих в клетке после обработки ХПС (Рисунок 54).

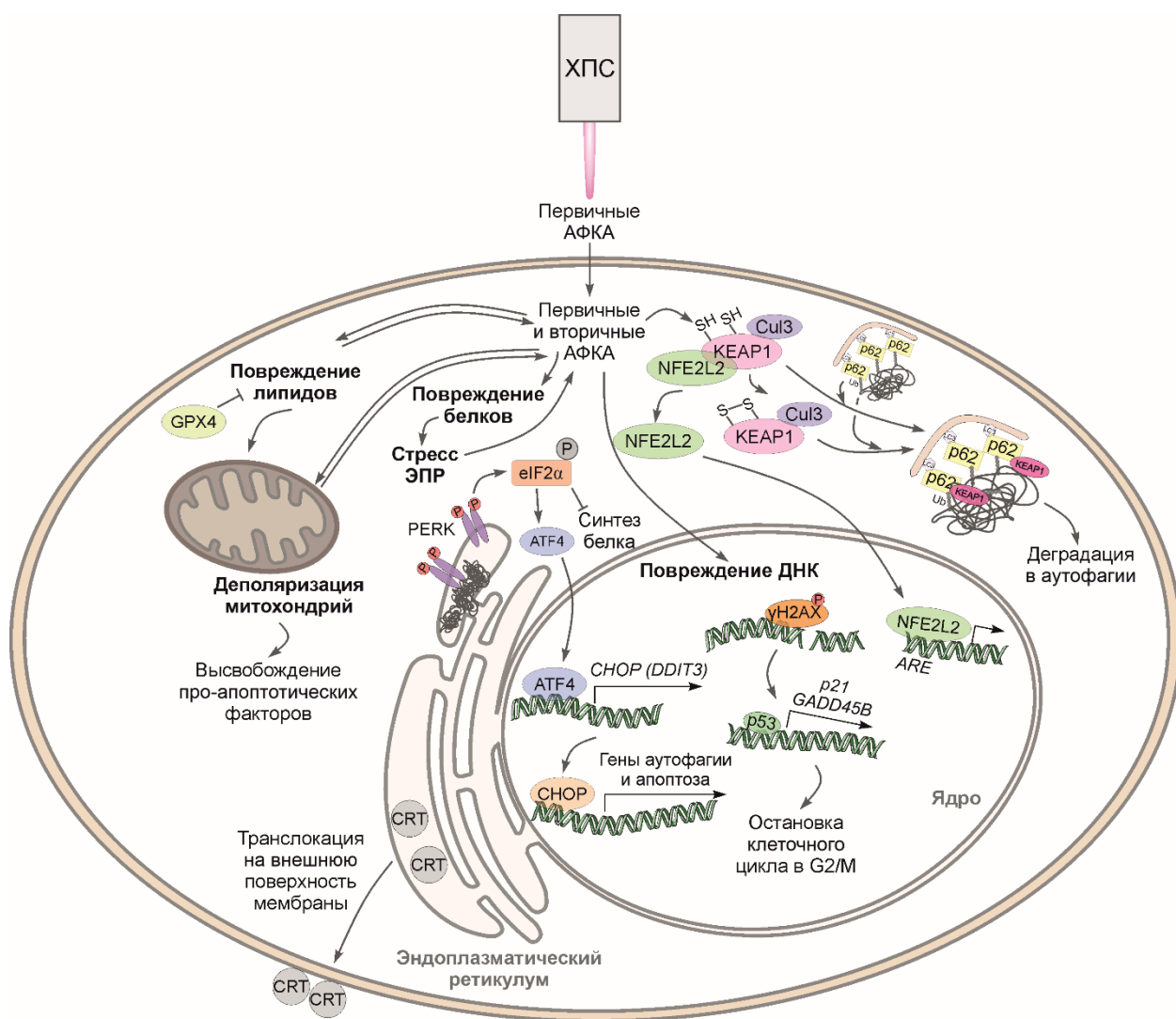


Рисунок 54 – Схема процессов, происходящих в клетке после обработки ХПС

На основании полученных в *in vitro* экспериментах данных можно заключить, что в случае сравнения клеток аденокарциномы легкого А-549 и фибробластов легкого Wi-38 существует несколько факторов, которые могут объяснить селективность ХПС по отношению к опухолевым клеткам.

Селективность ХПС по отношению к клеткам аденокарциномы легкого А-549 обусловлена различиями в генерации вторичных АФКА. Исследование накопления и нейтрализации внутриклеточных АФКА в клетках (Рисунок 18) показало, что динамика вторичных АФКА в фибробластах легкого отличается более активной их нейтрализацией, начиная с 2 часов после обработки, по сравнению с клетками аденокарциномы легкого. Эти данные коррелируют как с динамикой внеклеточных нитрит-ионов в среде (Рисунок 17), так и с перекисным окислением липидов мембран клеток (Рисунок 19).

Можно предположить, что именно вторичные АФКА, уровень которых в опухолевых клетках поддерживается высок, ответственны за окислительные повреждения белков, накопление их в ЭПР и инициацию стресса ЭПР в опухолевых клетках (пп. 3.4.4). Для устранения стресса ЭПР происходит активация аутофагии (пп. 3.4.5). Продолжающееся повреждение биомолекул и органелл вызывает как активацию дополнительных сигнальных путей, например, p53, MARK, так и подавление аутофагии и инициацию апоптоза в ответ на стресс ЭПР.

Стоит отметить, что апоптоз является не единственным возможным вариантом гибели клеток вследствие обработки ХПС. В данной работе показана активация характерных маркеров апоптоза в части клеток после обработки (пп. 3.4.6), однако другая часть клеток может погибать и по пути ферроптоза. Так, клетки А-549 по причине низкого содержания одного из ключевых ингибиторов ферроптоза – глутатионпероксидазы 4 (Рисунок 48) – и перекисного окисления липидов мембран (Рисунок 19) могут быть предрасположены к инициации этого типа гибели. Кроме того, важно отметить, что при выбранных условиях обработки происходит гибель не всех клеток (Рисунки 14 и 15), часть клеток способна преодолевать состояние стресса и продолжать пролиферацию, возможно, что часть клеток претерпевает переход в состояние репликативного старения, в этих клетках прогрессия клеточного цикла не восстанавливается. Эти процессы, а также пути преодоления устойчивости части клеток могут быть предметами дальнейших исследований, направленных на повышение селективности холодной плазмы.

Отдельного внимания и более детального исследования заслуживает активность антиоксидантных систем изучаемых клеток. В пп. 3.3.2 были описаны различия экспрессии генов в исследуемых культурах, белковые продукты которых участвуют в антиоксидантных процессах. Было показано, что в опухолевых клетках повышена экспрессия как антиоксидантных ферментов, так и важных транспортеров, например, транспортера цистина. Кроме того, в опухолевых клетках А-549 наблюдается повышенная по сравнению с фибробластами экспрессия генов ферментов гликолиза, ЦПЭ, анаболических процессов, что может обуславливать более активный метаболизм и, как следствие, более высокие базовые уровни АФКА. Как было отмечено в п. 1.9 обзора литературы, в работах других исследователей показана высокая корреляция чувствительности клеток к действию холодной плазмы с активностью метаболизма.

Таким образом, по результатам, полученным *in vitro* в данной работе, можно предложить модель, согласно которой чувствительность клеток к действию ХПС зависит от инициации стресса ЭПР, активности экспрессии генов *ATF4* и *DDIT3* и баланса между индукцией аутофагии и апоптоза. Модель может быть апробирована на группах клеток

другого гистологического происхождения. Кроме того, более подробного изучения заслуживает и описанная в литературе модель зависимости чувствительности клеток к обработке от активности метаболизма.

Результатом оптимизации параметров обработки клеток ХПС *in vitro* стало применение метода на животных с трансплантированными опухолями. Показано противоопухолевое действие ХПС, генерируемой в импульсном режиме (4,2 кВ, 30 кГц, продолжительность импульсов 7 мкс, скорость гелия 9 л/мин) в режиме шести прямых обработок опухолевых узлов. Достигнутый уровень ТРО составил 57% через 15 дней после начала лечения, что превышает эффективность метода, достигнутую в большинстве других исследований (Таблица 3).

Полученные в данной работе данные открывают новые пути разработки схем комбинированной терапии ХПС с препаратами-партнерами, что подчеркивает практическую значимость исследования. Так, можно предположить, что перспективным является использование молекул, ингибирующих аутофагию, направленную на преодоление стресса ЭПР, а также ингибиторов репарации клеточных мембран и ДНК. Кроме того, возможно применение препаратов, направленных на блокирование определенных типов гибели клеток, например, ферроптоза, для активации других путей гибели. Эти и другие подходы будут способствовать внедрению ХПС в клиническую практику для терапии онкопатологий.

ВЫВОДЫ

1. Определены параметры прямой обработки культивируемых клеток человека холодной плазменной струей (ХПС) в гелии, снижающей жизнеспособность преимущественно опухолевых клеток (индекс селективности равен 1,5). Показана индукция гибели клеток с признаками апоптоза.
2. Исследована динамика уровней внеклеточных и внутриклеточных АФКА после облучения ХПС опухолевых А-549 и здоровых Wi-38 клеток легкого человека в культуре.
 - Показано, что облучение ХПС ведет к дозозависимому увеличению концентрации NO_2^- в культуральной среде клеток.
 - Обработка ХПС приводит к увеличению содержания АФКА внутри клеток, в том числе за счет образования вторичных АФКА. Нейтрализация АФКА в здоровых клетках происходит быстрее, чем в опухолевых.
 - Повышенные уровни АФКА в клетках приводят к перекисному окислению липидов мембран.
3. На основании данных полнотранскриптомного секвенирования клеток А-549 и Wi-38 показаны различия в базовой транскрипционной активности генов метаболизма и генов, вовлеченных в ответ на окислительный стресс. В опухолевых клетках наблюдается повышенная экспрессия генов, участвующих в биосинтетических процессах, а также генов, регулирующих метаболизм глутатиона, железа и генов антиоксидантных ферментов.
4. Методами биоинформатического анализа транскриптома и анализа изменений основных молекулярных маркеров на примере клеточных линий А-549 и Wi-38 впервые изучен ранний и поздний ответы здоровых и опухолевых клеток на облучение ХПС.
 - Показана активацией сигнальных путей, участвующих в ответе на окислительный стресс, повреждение геномной ДНК, стресс эндоплазматического ретикулума, в регуляции гибели клеток, а также ингибирование прогрессии клеточного цикла.
 - Показана активация экспрессии генов *KLF4*, *FOS*, *ATF3*, *GADD45B* на уровне мРНК и генов *ATF3* и *GADD45B* на уровне белка.
 - В опухолевых клетках после обработки ХПС происходит активация экспрессии генов *ATF4* и *DDIT3*, связанных с ответом на стресс ЭПР, а также стресс-зависимое расширение просвета ЭПР.
 - Показана активация аутофагии как раннего клеточного ответа опухолевых и здоровых клеток на обработку ХПС. Аутофагия на раннем этапе препятствует индукции клеточной гибели.

- Построена молекулярная модель, объясняющая селективность ХПС по отношению к опухолевым клеткам.
5. Показано, что прямое облучение опухолевых узлов мышей-носителей меланомы В16 с помощью ХПС, генерируемой в импульсном режиме в течение 2 мин вызывает торможение роста опухоли до 57%.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Schweigert, I.V.; Zakrevsky, D.E.; Gugin, P.P.; Milakhina, E.; **Biryukov, M.**; Keidar, M.; Koval, O. Effect of Voltage Pulse Duration on Electrophysical and Thermal Characteristics of Cold Atmospheric Plasma Jet. *Plasma Sources Sci. Technol.* 2022, doi:10.1088/1361-6595/aca120.
2. Patrakova, E.; **Biryukov, M.**; Troitskaya, O.; Gugin, P.; Milakhina, E.; Semenov, D.; Poletaeva, J.; Ryabchikova, E.; Novak, D.; Kryachkova, N.; et al. Chloroquine Enhances Death in Lung Adenocarcinoma A549 Cells Exposed to Cold Atmospheric Plasma Jet. *Cells* 2023, 12, 290, doi:10.3390/cells12020290.
3. **Biryukov, M.**; Semenov, D.; Kryachkova, N.; Polyakova, A.; Patrakova, E.; Troitskaya, O.; Milakhina, E.; Poletaeva, J.; Gugin, P.; Ryabchikova, E.; et al. The Molecular Basis for Selectivity of the Cytotoxic Response of Lung Adenocarcinoma Cells to Cold Atmospheric Plasma. *Biomolecules* 2023, 13, 1672, doi:10.3390/biom13111672.
4. **Biryukov, M.**; Schweigert, I.; Polyakova, A.; Krychkova, N.; Varlamov, M.; Gorbunova, E.; Epanchintseva, A.; Pyshnaya, I.; Zakrevsky, D.; Milakhina, E.; et al. Cold Atmospheric Plasma Jet and Conjugates of Gold Nanoparticles with Tyrp1 Antibodies Efficiently Suppress Growth of B16 Tumor. *Plasma Medicine* 2025, 15, 1–16, doi: 10.1615/PlasmaMed.2025057895

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АФА – активные формы азота
АФК – активные формы кислорода
АФКА – активные формы кислорода и азота
АТФ – аденозинтрифосфат
ДБР – диэлектрический барьерный разряд
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены
ДТТ – дитиотреитол
ИС – индекс селективности
кДНК – кодирующая дезоксирибонуклеиновая кислота
мяРНК – малые ядерные РНК
ОТ-ПЦР РВ – обратная транскрипция - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
ПААГ – полиакриламидный гель
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РНК – рибонуклеиновая кислота
РНКазы А – рибонуклеаза А
рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота
СОД – супероксиддисмутаза
ТЕМЕД - N¹,N¹,N²,N²-тетраметилэтан-1,2-диамин
тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота
УФ – ультрафиолет
ХПС – холодная плазменная струя
ЦПЭ – цепь переноса электронов
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПР – эндоплазматический ретикулум / электронный парамагнитный резонанс
АСС – ацетил-СоА-карбоксилаза
ACLY – АТФ-цитратлиаза
AGE-RAGE – рецептор конечных продуктов гликирования
АКТ – серин/треонин-протеинкиназа АКТ
ANXA – аннексин А
АР-1 – активирующий белок 1

ARE – элементы ответа на антиоксиданты

ATF – активирующий транскрипционный фактор

ATG – белки, связанные с аутофагией

ATM – серин/треонин-протеинкиназа ATM (мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок)

ATR – серин/треонин-протеинкиназа ATR (атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок)

BAG3 – BCL2-ассоциированный антагонист 3

BAX – BCL2-ассоциированный белок X

Bcl2 – В-клеточная лимфома 2, регулятор апоптоза

BSA – бычий сывороточный альбумин

CAT – каталаза

CEBP – CCAAT/энхансер-связывающий белок

CDKN1A – ингибитор циклин-зависимой киназы 1A

CHK – контрольная киназа клеточного цикла

COXIV – цитохром С оксидаза IV

CQ – хлорохин

CREB – cAMP-ответный элемент-связывающий белок

CRT – кальретикулин

Cul3 – куллин 3

cAMP – циклический аденозинмонофосфат

DCF – 2',7'-дихлорофлуоресцеин

DDIT – индуцируемый повреждением ДНК транскрипт

DMEM – среда Игла, модифицированная Дульбекко

DMPO – 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид

DNAJB – DnaJ (Hsp40) гомолог, подсемейство B

DRP1 – динамин-1-подобный белок

DUOX – двойная оксидаза

EGR – ранний ген ответа

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста

ERK – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами

ERO1 – эндоплазматический оксиредуктин

ESCRT – эндосомный сортировочный комплекс, необходимый для транспорта

FAD – флавинадениндинуклеотид

FASN – синтаза жирных кислот

FBS – фетальная бычья сыворотка
 FGFR – рецептор фибробластного фактора роста
 FITC – флуоресцеин изотиоцианат
 FoxO – Forkhead box O транскрипционный фактор
 GABARAPL1 – GABA-рецептор-ассоциированный белок-подобный 1
 GADD45 – белок, ассоциированный с задержкой роста и индуцируемый повреждением ДНК 45
 GPX – глутатионпероксидаза
 H2AX – гистон H2A, вариант X
 HIF1A – субъединица альфа фактора, индуцируемого гипоксией
 HMOX – гемоксигеназа
 HSP – белок теплового шока
 IC50 – концентрация, ингибирующая 50% активности
 IKK – киназа ингибитора NF-κB
 JAK – янус-киназа
 JNK – c-Jun N-концевые киназы
 Jun – Jun прото-онкоген, субъединица транскрипционного фактора AP-1
 KEAP1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1
 KLF – Kruppel-подобный фактор транскрипции
 LC3 – Легкая цепь 3 альфа белка 1, ассоциированного с микротрубочками
 Maf – Maf прото-онкоген, транскрипционный фактор
 MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа
 MAPKK – киназа митоген-активируемая протеинкиназы
 MAPKKK – киназа киназы митоген-активируемая протеинкиназы
 MDM – MDM2 прото-онкоген, E3 убиквитин-лигаза
 MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид
 Мус – MYC прото-онкоген, транскрипционный фактор
 NAC – N-ацетилцистеин
 NED – N-(1-нафтил)этилендиамин
 NELFE – негативный элонгационный фактор E
 NFE2L2 (NRF2) – ядерный фактор эритроидного происхождения 2-подобный 2
 NF-κB – ядерный фактор каппа-легкой цепи энхансера активированных В-клеток
 NOX – NADPH оксидаза
 NOS – NO-синтаза
 P53 – транскрипционный фактор TP53

PARP – поли(АДФ-рибоза)полимераза
PBS – фосфатно-солевой буфер
PDGFR – рецептор тромбоцитарного фактора роста
PE – фитоэритрин
PDI – дисульфидизомераза белков
PINK1 – PTEN-индуцируемая киназа 1
PRDX – пероксиредоксин
RAS – RAS прото-онкоген
Ref-1 (APEX1) – апуриновая/апиримидиновая эндодезоксирибонуклеаза
SDS – додецилсульфат натрия
sGC – растворимая гуанилатциклаза
SMAD – SMAD медиатор сигнала TGF-бета
SQSTM1 – секвестосома 1
STAT – сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции
TEMP – 2,2,6,6-тетраметилпиперидин
TEMPO – 2,2,6,6-тетраметилпиперидин 1-оксил
TGF – трансформирующий фактор роста
TLR – Toll-подобный рецептор
TNF – фактор некроза опухоли
TXN – тиоредоксин
ULK1 – серин/треонин-протеинкиназа ULK1
VEGFR – рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Debela D.T. et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives // *SAGE Open Medicine*. 2021. Vol. 9. P. 20503121211034366.
2. Xiang Y. et al. Mechanisms of resistance to targeted therapy and immunotherapy in non-small cell lung cancer: promising strategies to overcoming challenges // *Front. Immunol*. 2024. Vol. 15. P. 1366260.
3. Schweigert I. et al. Interaction of Cold Atmospheric Argon and Helium Plasma Jets with Bio-Target with Grounded Substrate Beneath // *Applied Sciences*. 2019. Vol. 9, № 21. P. 4528.
4. Schweigert I. et al. Analysis of Grounded Substrate Effects on Cold Atmospheric Plasma Jet Irradiation of Cellular and Animal models // *J. Phys.: Conf. Ser.* 2020. Vol. 1698, № 1. P. 012010.
5. Troitskaya O. et al. Non-Thermal Plasma Application in Tumor-Bearing Mice Induces Increase of Serum HMGB1 // *IJMS*. 2020. Vol. 21, № 14. P. 5128.
6. Troitskaya O. et al. Immunological Effects of Cold Atmospheric Plasma-Treated Cells in Comparison with Those of Cells Treated with Lactaptin-Based Anticancer Drugs // *Biophysica*. 2022. Vol. 2, № 3. P. 266–280.
7. Goldston R.J. *Introduction to Plasma Physics*. 1st ed. CRC Press, 1995.
8. Chen F.F. *Introduction to Plasma Physics and Controlled Fusion*. Cham: Springer International Publishing, 2016.
9. Cressault Y. et al. Non-equilibrium phenomena in thermal plasmas // *Plasma Res. Express*. 2020. Vol. 2, № 4. P. 043001.
10. Veerana M. et al. Recent Advances in Non-Thermal Plasma for Seed Germination, Plant Growth, and Secondary Metabolite Synthesis: A Promising Frontier for Sustainable Agriculture // *Plasma Chem Plasma Process*. 2024. Vol. 44, № 6. P. 2263–2302.
11. Laroussi M. Cold Plasma in Medicine and Healthcare: The New Frontier in Low Temperature Plasma Applications // *Front. Phys.* 2020. Vol. 8. P. 74.
12. Weltmann K.D. et al. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine // *Pure and Applied Chemistry*. 2010. Vol. 82, № 6. P. 1223–1237.
13. Weltmann K.-D., Von Woedtke T. Plasma medicine—current state of research and medical application // *Plasma Phys. Control. Fusion*. 2017. Vol. 59, № 1. P. 014031.
14. Javanmard S., Pouryoussefi S.G. Comparison of characteristics of atmospheric pressure plasma jets using argon and helium working gases // *Current Applied Physics*. 2023. Vol. 46. P. 61–69.

15. Hoffmann C., Berganza C., Zhang J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology // *Med Gas Res.* 2013. Vol. 3, № 1. P. 21.
16. Ruchel Khanikar R., Bailing H. Cold Atmospheric Pressure Plasma Technology for Biomedical Application // *Plasma Science and Technology* / ed. Shahzad A. IntechOpen, 2022.
17. Zhang H. et al. Study on the detection of active components in plasma-activated water and its storage stability // *CyTA - Journal of Food.* 2024. Vol. 22, № 1. P. 2386417.
18. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, 2015.
19. Stuhr R., Bayer P., Von Wangelin A.J. The Diverse Modes of Oxygen Reactivity in Life & Chemistry // *ChemSusChem.* 2022. Vol. 15, № 24. P. e202201323.
20. Hirakawa K. Biomolecules Oxidation by Hydrogen Peroxide and Singlet Oxygen // *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells* / ed. Filip C., Albu E. InTech, 2018.
21. Agnez-Lima L.F. et al. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms // *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2012. Vol. 751, № 1. P. 15–28.
22. Gracanin M. et al. Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: Formation of tryptophan peroxides and decomposition products // *Free Radical Biology and Medicine.* 2009. Vol. 47, № 1. P. 92–102.
23. Collin F. Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases // *IJMS.* 2019. Vol. 20, № 10. P. 2407.
24. Juan C.A. et al. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies // *IJMS.* 2021. Vol. 22, № 9. P. 4642.
25. Jomova K. et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging // *Arch Toxicol.* 2023. Vol. 97, № 10. P. 2499–2574.
26. Andrés C.M.C. et al. Chemistry of Hydrogen Peroxide Formation and Elimination in Mammalian Cells, and Its Role in Various Pathologies // *Stresses.* 2022. Vol. 2, № 3. P. 256–274.
27. Yang P. et al. Aqueous ozone decomposition kinetics in a rotating packed bed // *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.* 2019. Vol. 96. P. 11–17.
28. Sharma V.K., Graham N.J.D. Oxidation of Amino Acids, Peptides and Proteins by Ozone: A Review // *Ozone: Science & Engineering.* 2010. Vol. 32, № 2. P. 81–90.
29. Ito K. et al. Mechanism of site-specific DNA damage induced by ozone // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2005. Vol. 585, № 1–2. P. 60–70.
30. Forstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function // *European Heart Journal.* 2012. Vol. 33, № 7. P. 829–837.

31. Garmaroudi F.S. et al. Systems Pharmacology and Rational Polypharmacy: Nitric Oxide–Cyclic GMP Signaling Pathway as an Illustrative Example and Derivation of the General Case // *PLoS Comput Biol* / ed. Zhou X.J. 2016. Vol. 12, № 3. P. e1004822.
32. Drew B., Leeuwenburgh C. Aging and the Role of Reactive Nitrogen Species // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002. Vol. 959, № 1. P. 66–81.
33. Radi R. Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant // *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288, № 37. P. 26464–26472.
34. Bartesaghi S., Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration // *Redox Biology*. 2018. Vol. 14. P. 618–625.
35. Goldstein S., Samuni A. Chemistry of nitrogen dioxide and its biological implications // *Redox Biochemistry and Chemistry*. 2024. Vol. 7. P. 100020.
36. Ma L. et al. Nitrate and Nitrite in Health and Disease // *Aging and disease*. 2018. Vol. 9, № 5. P. 938.
37. Shiva S. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function // *Redox Biology*. 2013. Vol. 1, № 1. P. 40–44.
38. Winterbourn C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species // *Nat Chem Biol*. 2008. Vol. 4, № 5. P. 278–286.
39. Lau N., Pluth M.D. Reactive sulfur species (RSS): persulfides, polysulfides, potential, and problems // *Current Opinion in Chemical Biology*. 2019. Vol. 49. P. 1–8.
40. Olson K.R. Reactive oxygen species or reactive sulfur species: why we should consider the latter // *Journal of Experimental Biology*. 2020. Vol. 223, № 4. P. jeb196352.
41. Sawa T. et al. Chemical Biology of Reactive Sulfur Species: Hydrolysis-Driven Equilibrium of Polysulfides as a Determinant of Physiological Functions // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2022. Vol. 36, № 4–6. P. 327–336.
42. Khodade V.S., Toscano J.P. Reactive Sulfur Species in Biology and Medicine // *Antioxidants*. 2023. Vol. 12, № 9. P. 1759.
43. Khramova Y.V. et al. Reactive Halogen Species: Role in Living Systems and Current Research Approaches // *Biochemistry Moscow*. 2024. Vol. 89, № S1. P. S90–S111.
44. Tang Y. et al. Strategies for designing organic fluorescent probes for biological imaging of reactive carbonyl species // *Chem. Soc. Rev*. 2019. Vol. 48, № 15. P. 4036–4048.
45. Radi R. Interplay of carbon dioxide and peroxide metabolism in mammalian cells // *Journal of Biological Chemistry*. 2022. Vol. 298, № 9. P. 102358.
46. Brand M.D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling // *Free Radical Biology and Medicine*. 2016. Vol. 100. P. 14–31.

47. Wong H.-S. et al. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions // *Journal of Biological Chemistry*. 2017. Vol. 292, № 41. P. 16804–16809.
48. Quinlan C.L. et al. The 2-Oxoacid Dehydrogenase Complexes in Mitochondria Can Produce Superoxide/Hydrogen Peroxide at Much Higher Rates Than Complex I // *Journal of Biological Chemistry*. 2014. Vol. 289, № 12. P. 8312–8325.
49. Cipriano A. et al. NADPH Oxidases: From Molecular Mechanisms to Current Inhibitors // *J. Med. Chem.* 2023. Vol. 66, № 17. P. 11632–11655.
50. Noda M. et al. Effects of Xanthine Oxidoreductase Inhibitors on Reactive Oxygen Species Produced *In Vitro* from Xanthine Oxidase // *BPB Reports*. 2023. Vol. 6, № 6. P. 189–192.
51. Veith A., Moorthy B. Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species // *Current Opinion in Toxicology*. 2018. Vol. 7. P. 44–51.
52. Shergalis A.G. et al. Role of the ERO1-PDI interaction in oxidative protein folding and disease // *Pharmacology & Therapeutics*. 2020. Vol. 210. P. 107525.
53. Mackova V. et al. Navigating the redox landscape: reactive oxygen species in regulation of cell cycle // *Redox Report*. 2024. Vol. 29, № 1. P. 2371173.
54. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease // *Physiological Reviews*. 2007. Vol. 87, № 1. P. 315–424.
55. Bar-Shai M., Reznick A.Z. Peroxynitrite Induces an Alternative NF- κ B Activation Pathway in L8 Rat Myoblasts // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006. Vol. 8, № 3–4. P. 639–652.
56. Zheng M. et al. The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine, Food, and Cosmetics // *Antioxidants*. 2023. Vol. 12, № 9. P. 1675.
57. House J.E., House K.A. *Inorganic Substances in Biochemical Applications // Descriptive Inorganic Chemistry*. Elsevier, 2016. P. 395–409.
58. Yuzugullu Karakus Y. Typical Catalases: Function and Structure // *Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease* / ed. Dulce Bagatini M. IntechOpen, 2020.
59. Fujiki Y., Bassik M.C. A New Paradigm in Catalase Research // *Trends in Cell Biology*. 2021. Vol. 31, № 3. P. 148–151.
60. Böhm B. et al. Extracellular localization of catalase is associated with the transformed state of malignant cells // *Biological Chemistry*. 2015. Vol. 396, № 12. P. 1339–1356.
61. Glorieux C., Buc Calderon P. Targeting catalase in cancer // *Redox Biology*. 2024. Vol. 77. P. 103404.
62. Nicholls P. Classical catalase: Ancient and modern // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012. Vol. 525, № 2. P. 95–101.

63. Gebicka L., Krych-Madej J. The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2019. Vol. 197. P. 110699.
64. Pei J. et al. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxiation // *Front. Pharmacol.* 2023. Vol. 14. P. 1147414.
65. Bersuker K. et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis // *Nature*. 2019. Vol. 575, № 7784. P. 688–692.
66. Nguyen V.D. et al. Two Endoplasmic Reticulum PDI Peroxidases Increase the Efficiency of the Use of Peroxide during Disulfide Bond Formation // *Journal of Molecular Biology*. 2011. Vol. 406, № 3. P. 503–515.
67. Kanemura S. et al. Characterization of the endoplasmic reticulum–resident peroxidases GPx7 and GPx8 shows the higher oxidative activity of GPx7 and its linkage to oxidative protein folding // *Journal of Biological Chemistry*. 2020. Vol. 295, № 36. P. 12772–12785.
68. Bhowmick D., Muges G. Insights into the catalytic mechanism of synthetic glutathione peroxidase mimetics // *Org. Biomol. Chem.* 2015. Vol. 13, № 41. P. 10262–10272.
69. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2013. Vol. 1830, № 5. P. 3217–3266.
70. Karpenko I.L. et al. Peroxiredoxins—The Underrated Actors during Virus-Induced Oxidative Stress // *Antioxidants*. 2021. Vol. 10, № 6. P. 977.
71. Nicolussi A. et al. The role of peroxiredoxins in cancer // *Molecular and Clinical Oncology*. 2017. Vol. 6, № 2. P. 139–153.
72. Manta B. et al. The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2 // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2009. Vol. 484, № 2. P. 146–154.
73. Rhee S.G. Overview on Peroxiredoxin // *Molecules and Cells*. 2016. Vol. 39, № 1. P. 1–5.
74. Thul P.J. et al. A subcellular map of the human proteome // *Science*. 2017. Vol. 356, № 6340. P. eaal3321.
75. TXN2 protein expression summary - The Human Protein Atlas [Электронный ресурс]. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000100348-TXN2> (дата обращения: 16.04.2025).
76. TXN protein expression summary - The Human Protein Atlas [Электронный ресурс]. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136810-TXN> (дата обращения: 16.04.2025).

77. Collet J.-F., Messens J. Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010. Vol. 13, № 8. P. 1205–1216.
78. AlOkda A., Van Raamsdonk J.M. Evolutionarily Conserved Role of Thioredoxin Systems in Determining Longevity // *Antioxidants*. 2023. Vol. 12, № 4. P. 944.
79. Niki E. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2016. Vol. 595. P. 19–24.
80. Sies H., Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 1985. Vol. 311, № 1152. P. 617–631.
81. Sies H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects // *Antioxidants*. 2020. Vol. 9, № 9. P. 852.
82. Nitti M. et al. Hormesis and Oxidative Distress: Pathophysiology of Reactive Oxygen Species and the Open Question of Antioxidant Modulation and Supplementation // *Antioxidants*. 2022. Vol. 11, № 8. P. 1613.
83. Steen C.J. et al. EPR Spin-Trapping for Monitoring Temporal Dynamics of Singlet Oxygen during Photoprotection in Photosynthesis // *Biochemistry*. 2024. Vol. 63, № 9. P. 1214–1224.
84. Stolze K., Udilova N., Nohl H. Spin trapping of lipid radicals with DEPMPO-derived spin traps: detection of superoxide, alkyl and alkoxy radicals in aqueous and lipid phase // *Free Radical Biology and Medicine*. 2000. Vol. 29, № 10. P. 1005–1014.
85. Zielonka J., Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B. Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine // *Nat Protoc*. 2008. Vol. 3, № 1. P. 8–21.
86. Fernandes D.C., Gonçalves R.C., Laurindo F.R.M. Measurement of Superoxide Production and NADPH Oxidase Activity by HPLC Analysis of Dihydroethidium Oxidation // *Hypertension* / ed. Touyz R.M., Schiffrin E.L. New York, NY: Springer New York, 2017. Vol. 1527. P. 233–249.
87. Eruslanov E., Kusmartsev S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry // *Advanced Protocols in Oxidative Stress II* / ed. Armstrong D. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. Vol. 594. P. 57–72.
88. Reuter S., Von Woedtke T., Weltmann K.-D. The kINPen—a review on physics and chemistry of the atmospheric pressure plasma jet and its applications // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2018. Vol. 51, № 23. P. 233001.
89. Yu D. et al. Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: New insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2021. Vol. 339. P. 129878.

90. Karakuzu O. et al. Amplex Red Assay for Measuring Hydrogen Peroxide Production from *Caenorhabditis elegans* // *BIO-PROTOCOL*. 2019. Vol. 9, № 21.
91. Zhang Y., Dai M., Yuan Z. Methods for the detection of reactive oxygen species // *Anal. Methods*. 2018. Vol. 10, № 38. P. 4625–4638.
92. Bilan D.S., Belousov V.V. *In Vivo* Imaging of Hydrogen Peroxide with HyPer Probes // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2018. Vol. 29, № 6. P. 569–584.
93. Singhapphan P., Unob F. Thread-based platform for nitrite detection based on a modified Griess assay // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2021. Vol. 327. P. 128938.
94. Bryan N.S., Grisham M.B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples // *Free Radical Biology and Medicine*. 2007. Vol. 43, № 5. P. 645–657.
95. Giustarini D. et al. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization // *Methods in Enzymology*. Elsevier, 2008. Vol. 440. P. 361–380.
96. Duanghathaipornsuk S. et al. Detection Technologies for Reactive Oxygen Species: Fluorescence and Electrochemical Methods and Their Applications // *Biosensors*. 2021. Vol. 11, № 2. P. 30.
97. Liu X. et al. A sensitively non-enzymatic amperometric sensor and its application in living cell superoxide anion radical detection // *Talanta*. 2018. Vol. 186. P. 248–255.
98. Wu L. et al. Sensitive electrochemical detection of hydroxyl radical with biobarcode amplification // *Analytica Chimica Acta*. 2012. Vol. 756. P. 1–6.
99. Rojas D. et al. New trends in enzyme-free electrochemical sensing of ROS/RNS. Application to live cell analysis // *Microchim Acta*. 2022. Vol. 189, № 3. P. 102.
100. Kai T. et al. Initial yield of hydrated electron production from water radiolysis based on first-principles calculation // *RSC Adv*. 2023. Vol. 13, № 11. P. 7076–7086.
101. Xu X. et al. Enhanced Intracellular Reactive Oxygen Species by Photodynamic Therapy Effectively Promotes Chemoresistant Cell Death // *Int. J. Biol. Sci*. 2022. Vol. 18, № 1. P. 374–385.
102. Lee W., Tran T.N., Oh C.-H. Role of helium metastable state in the interaction between He atmospheric pressure plasma jet and ns pulsed laser // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2023. Vol. 201. P. 106628.
103. Park J.Y., Bae J.H., Lee S. Characteristics of Aqueous Chemical Species Generation in Plasma-Facing Liquid Systems Using Helium Jet Plasma // *ChemistryOpen*. 2024. Vol. 13, № 7. P. e202300213.
104. Liu K. et al. Insights into generation of OH radicals in plasma jets with constant power: The effects of driving voltage and frequency // *Vacuum*. 2022. Vol. 198. P. 110901.

105. Sun W.-T. et al. The back-diffusion effect of air on the discharge characteristics of atmospheric-pressure radio-frequency glow discharges using bare metal electrodes // *Plasma Sources Sci. Technol.* 2007. Vol. 16, № 2. P. 290–296.
106. Gaens W.V. et al. Numerical analysis of the effect of nitrogen and oxygen admixtures on the chemistry of an argon plasma jet operating at atmospheric pressure // *New J. Phys.* 2015. Vol. 17, № 3. P. 033003.
107. Schröter S. et al. Chemical kinetics in an atmospheric pressure helium plasma containing humidity // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018. Vol. 20, № 37. P. 24263–24286.
108. Winter J. et al. Feed gas humidity: a vital parameter affecting a cold atmospheric-pressure plasma jet and plasma-treated human skin cells // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2013. Vol. 46, № 29. P. 295401.
109. Kong D. et al. Influence of nitrogen and oxygen admixture on the development of helium atmospheric-pressure plasma jet // *Journal of Applied Physics.* 2021. Vol. 129, № 10. P. 103303.
110. Bruggeman P.J. et al. Plasma–liquid interactions: a review and roadmap // *Plasma Sources Sci. Technol.* 2016. Vol. 25, № 5. P. 053002.
111. Zhou R. et al. Cold atmospheric plasma activated water as a prospective disinfectant: the crucial role of peroxyxynitrite // *Green Chem.* 2018. Vol. 20, № 23. P. 5276–5284.
112. Chauvin J. et al. Analysis of reactive oxygen and nitrogen species generated in three liquid media by low temperature helium plasma jet // *Sci Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 4562.
113. Sardella E. et al. Plasma Treated Water Solutions in Cancer Treatments: The Contrasting Role of RNS // *Antioxidants.* 2021. Vol. 10, № 4. P. 605.
114. Comino-Sanz I.M. et al. The Role of Antioxidants on Wound Healing: A Review of the Current Evidence // *JCM.* 2021. Vol. 10, № 16. P. 3558.
115. Bolgeo T. et al. The Role of Cold Atmospheric Plasma in Wound Healing Processes in Critically Ill Patients // *JPM.* 2023. Vol. 13, № 5. P. 736.
116. Dubey S.K. et al. Cold atmospheric plasma therapy in wound healing // *Process Biochemistry.* 2022. Vol. 112. P. 112–123.
117. Bakker O. et al. Improved Wound Healing by Direct Cold Atmospheric Plasma Once or Twice a Week: A Randomized Controlled Trial on Chronic Venous Leg Ulcers // *Advances in Wound Care.* 2025. Vol. 14, № 1. P. 1–13.
118. Ju S. et al. Oxidative Stress and Cancer Therapy: Controlling Cancer Cells Using Reactive Oxygen Species // *IJMS.* 2024. Vol. 25, № 22. P. 12387.
119. Ngo V., Duennwald M.L. Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease // *Antioxidants.* 2022. Vol. 11, № 12. P. 2345.

120. Wakabayashi N. et al. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004. Vol. 101, № 7. P. 2040–2045.
121. He F., Ru X., Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond // IJMS. 2020. Vol. 21, № 13. P. 4777.
122. Keap1–Nrf2 Pathway [Электронный ресурс]. URL: <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5fbd5f8be6db00a4d9cced-keap1-nrf2-pathway> (дата обращения: 16.04.2025).
123. Pajares M. et al. Transcription factor NFE2L2/NRF2 is a regulator of macroautophagy genes // Autophagy. 2016. Vol. 12, № 10. P. 1902–1916.
124. Raghunath A. et al. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications // Redox Biology. 2018. Vol. 17. P. 297–314.
125. Wu Z., Nicoll M., Ingham R.J. AP-1 family transcription factors: a diverse family of proteins that regulate varied cellular activities in classical hodgkin lymphoma and ALK+ ALCL // Exp Hematol Oncol. 2021. Vol. 10, № 1. P. 4.
126. Hong Y. et al. Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution // Antioxidants. 2024. Vol. 13, № 3. P. 312.
127. Janssen Y.M.W., Matalon S., Mossman B.T. Differential induction of *c-fos*, *c-jun*, and apoptosis in lung epithelial cells exposed to ROS or RNS // American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 1997. Vol. 273, № 4. P. L789–L796.
128. Garces De Los Fayos Alonso I. et al. The Role of Activator Protein-1 (AP-1) Family Members in CD30-Positive Lymphomas // Cancers. 2018. Vol. 10, № 4. P. 93.
129. Gius D. et al. Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors NF- κ B and AP-1 // Toxicology Letters. 1999. Vol. 106, № 2–3. P. 93–106.
130. Liu Y. et al. Oxidative stress regulates mitogen-activated protein kinases and c-Jun activation involved in heat stress and lipopolysaccharide-induced intestinal epithelial cell apoptosis // Molecular Medicine Reports. 2017. Vol. 16, № 3. P. 2579–2587.
131. Guo Y. et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review) // Exp Ther Med. 2020.
132. Pua L.J.W. et al. Functional Roles of JNK and p38 MAPK Signaling in Nasopharyngeal Carcinoma // IJMS. 2022. Vol. 23, № 3. P. 1108.
133. Weng M.-S. et al. The interplay of reactive oxygen species and the epidermal growth factor receptor in tumor progression and drug resistance // J Exp Clin Cancer Res. 2018. Vol. 37, № 1. P. 61.

134. Takata T. et al. Oxidative Stress Orchestrates MAPK and Nitric-Oxide Synthase Signal // *IJMS*. 2020. Vol. 21, № 22. P. 8750.
135. Shiizaki S., Naguro I., Ichijo H. Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling // *Advances in Biological Regulation*. 2013. Vol. 53, № 1. P. 135–144.
136. Gkouveris I., Nikitakis N.G. Role of JNK signaling in oral cancer: A mini review // *Tumour Biol*. 2017. Vol. 39, № 6. P. 101042831771165.
137. Canovas B., Nebreda A.R. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021. Vol. 22, № 5. P. 346–366.
138. Yue J., López J.M. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis // *IJMS*. 2020. Vol. 21, № 7. P. 2346.
139. Liu D., Xu Y. p53, Oxidative Stress, and Aging // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011. Vol. 15, № 6. P. 1669–1678.
140. Liu B., Chen Y., St. Clair D.K. ROS and p53: A versatile partnership // *Free Radical Biology and Medicine*. 2008. Vol. 44, № 8. P. 1529–1535.
141. Sun B. et al. Contribution of ATM and ATR kinase pathways to p53-mediated response in etoposide and methyl methanesulfonate induced DNA damage // *Environ and Mol Mutagen*. 2017. Vol. 58, № 2. P. 72–83.
142. P53 Regulation and Signaling [Электронный ресурс]. URL: <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5ed6aee0cc82d300ae328919-p53-regulation-and-signaling> (дата обращения: 16.04.2025).
143. Gloire G., Legrand-Poels S., Piette J. NF-κB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later // *Biochemical Pharmacology*. 2006. Vol. 72, № 11. P. 1493–1505.
144. Gao W. et al. Dissecting the Crosstalk Between Nrf2 and NF-κB Response Pathways in Drug-Induced Toxicity // *Front. Cell Dev. Biol*. 2022. Vol. 9. P. 809952.
145. Morgan M.J., Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling // *Cell Res*. 2011. Vol. 21, № 1. P. 103–115.
146. Stoffels E., Kieft I.E., Sladek R.E.J. Superficial treatment of mammalian cells using plasma needle // *J. Phys. D: Appl. Phys*. 2003. Vol. 36, № 23. P. 2908–2913.
147. Calugaru A. et al. The effect of the plasma needle on tumoral cell lines apoptosis // *Roum Arch Microbiol Immunol*. 2005. Vol. 64, № 1–4. P. 57–64.
148. Vandamme M. et al. Antitumor Effect of Plasma Treatment on U87 Glioma Xenografts: Preliminary Results // *Plasma Processes & Polymers*. 2010. Vol. 7, № 3–4. P. 264–273.

149. Tanaka H. et al. Plasma-Activated Medium Selectively Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival Signaling Molecule, AKT Kinase // *Plasma Med.* 2011. Vol. 1, № 3–4. P. 265–277.
150. Zucker S.N. et al. Preferential induction of apoptotic cell death in melanoma cells as compared with normal keratinocytes using a non-thermal plasma torch // *Cancer Biology & Therapy.* 2012. Vol. 13, № 13. P. 1299–1306.
151. Kang S.U. et al. Nonthermal plasma induces head and neck cancer cell death: the potential involvement of mitogen-activated protein kinase-dependent mitochondrial reactive oxygen species // *Cell Death Dis.* 2014. Vol. 5, № 2. P. e1056–e1056.
152. Mirpour S. et al. Utilizing the micron sized non-thermal atmospheric pressure plasma inside the animal body for the tumor treatment application // *Sci Rep.* 2016. Vol. 6, № 1. P. 29048.
153. Keidar M. et al. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy // *Br J Cancer.* 2011. Vol. 105, № 9. P. 1295–1301.
154. Hou J. et al. Non-thermal plasma treatment altered gene expression profiling in non-small-cell lung cancer A549 cells // *BMC Genomics.* 2015. Vol. 16, № 1. P. 435.
155. 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.
156. 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.
157. Zhao L. et al. Biosafety and differentially expressed genes analysis of melanoma cells treated with cold atmospheric plasma // *Journal of Biophotonics.* 2022. Vol. 15, № 6. P. e202100403.
158. Oh C. et al. Head and Neck Cancer Cell Death due to Mitochondrial Damage Induced by Reactive Oxygen Species from Nonthermal Plasma-Activated Media: Based on Transcriptomic Analysis // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* / ed. Ghose J. 2021. Vol. 2021, № 1. P. 9951712.
159. Jung S.-N. et al. EGR1/GADD45 α Activation by ROS of Non-Thermal Plasma Mediates Cell Death in Thyroid Carcinoma // *Cancers.* 2021. Vol. 13, № 2. P. 351.
160. Lee S. et al. Cold atmospheric plasma restores tamoxifen sensitivity in resistant MCF-7 breast cancer cell // *Free Radical Biology and Medicine.* 2017. Vol. 110. P. 280–290.

161. Park S. et al. Cold Atmospheric Plasma Restores Paclitaxel Sensitivity to Paclitaxel-Resistant Breast Cancer Cells by Reversing Expression of Resistance-Related Genes // *Cancers*. 2019. Vol. 11, № 12. P. 2011.
162. Miebach L. et al. Gas plasma–oxidized sodium chloride acts via hydrogen peroxide in a model of peritoneal carcinomatosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2022. Vol. 119, № 31. P. e2200708119.
163. Guo B. et al. Aberrant Expressional Profiling of Small RNA by Cold Atmospheric Plasma Treatment in Human Chronic Myeloid Leukemia Cells // *Front. Genet.* 2022. Vol. 12. P. 809658.
164. Kalghatgi S. et al. Effects of Non-Thermal Plasma on Mammalian Cells // *PLoS ONE* / ed. Koutsopoulos S. 2011. Vol. 6, № 1. P. e16270.
165. Hanahan D., Weinberg R.A. The Hallmarks of Cancer // *Cell*. 2000. Vol. 100, № 1. P. 57–70.
166. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation // *Cell*. 2011. Vol. 144, № 5. P. 646–674.
167. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions // *Cancer Discovery*. 2022. Vol. 12, № 1. P. 31–46.
168. Tufail M., Jiang C.-H., Li N. Altered metabolism in cancer: insights into energy pathways and therapeutic targets // *Mol Cancer*. 2024. Vol. 23, № 1. P. 203.
169. Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation // *Science*. 2009. Vol. 324, № 5930. P. 1029–1033.
170. Mendler A.N. et al. Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation // *Intl Journal of Cancer*. 2012. Vol. 131, № 3. P. 633–640.
171. Pavlova N.N., Thompson C.B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism // *Cell Metabolism*. 2016. Vol. 23, № 1. P. 27–47.
172. Lounis M.A. et al. Modulation of de Novo Lipogenesis Improves Response to Enzalutamide Treatment in Prostate Cancer // *Cancers*. 2020. Vol. 12, № 11. P. 3339.
173. Xiao M. et al. Functional significance of cholesterol metabolism in cancer: from threat to treatment // *Exp Mol Med*. 2023. Vol. 55, № 9. P. 1982–1995.
174. Zhao X. et al. Accumulated cholesterol protects tumours from elevated lipid peroxidation in the microenvironment // *Redox Biology*. 2023. Vol. 62. P. 102678.
175. Sciacovelli M. et al. The Metabolic Alterations of Cancer Cells // *Methods in Enzymology*. Elsevier, 2014. Vol. 542. P. 1–23.

176. Kim J. et al. Evaluation of Myc E-Box Phylogenetic Footprints in Glycolytic Genes by Chromatin Immunoprecipitation Assays // *Molecular and Cellular Biology*. 2004. Vol. 24, № 13. P. 5923–5936.
177. Dong Y. et al. Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver's seat // *Sig Transduct Target Ther*. 2020. Vol. 5, № 1. P. 124.
178. Mukhopadhyay S., Vander Heiden M.G., McCormick F. The metabolic landscape of RAS-driven cancers from biology to therapy // *Nat Cancer*. 2021. Vol. 2, № 3. P. 271–283.
179. Fontana F. et al. The PI3K/Akt Pathway and Glucose Metabolism: A Dangerous Liaison in Cancer // *Int. J. Biol. Sci*. 2024. Vol. 20, № 8. P. 3113–3125.
180. Ogrunc M. et al. Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation // *Cell Death Differ*. 2014. Vol. 21, № 6. P. 998–1012.
181. Miwa S. et al. Low abundance of the matrix arm of complex I in mitochondria predicts longevity in mice // *Nat Commun*. 2014. Vol. 5, № 1. P. 3837.
182. Raimondi V., Ciccarese F., Ciminale V. Oncogenic pathways and the electron transport chain: a dangeROS liaison // *Br J Cancer*. 2020. Vol. 122, № 2. P. 168–181.
183. Weinberg F. et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2010. Vol. 107, № 19. P. 8788–8793.
184. Dindi U.M.R. et al. Ameliorative inhibition of sirtuin 6 by imidazole derivative triggers oxidative stress-mediated apoptosis associated with Nrf2/Keap1 signaling in non-small cell lung cancer cell lines // *Front. Pharmacol*. 2024. Vol. 14. P. 1335305.
185. Chen J. et al. TYMS Enhances Colorectal Cell Antioxidant Capacity Via the KEAP1-NRF2 Pathway to Resist Ferroptosis // *J. Cancer*. 2025. Vol. 16, № 2. P. 417–429.
186. Semmler M.L. et al. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment // *Cancers*. 2020. Vol. 12, № 2. P. 269.
187. 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.
188. Van Der Paal J. et al. How membrane lipids influence plasma delivery of reactive oxygen species into cells and subsequent DNA damage: an experimental and computational study // *Phys. Chem. Chem. Phys*. 2019. Vol. 21, № 35. P. 19327–19341.
189. Van Der Paal J. et al. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress // *Chem. Sci*. 2016. Vol. 7, № 1. P. 489–498.

190. Bekeschus S. et al. Tumor cell metabolism correlates with resistance to gas plasma treatment: The evaluation of three dogmas // *Free Radical Biology and Medicine*. 2021. Vol. 167. P. 12–28.
191. Duan J. et al. On the penetration of reactive oxygen and nitrogen species generated by a plasma jet into and through mice skin with/without stratum corneum // *Physics of Plasmas*. 2019. Vol. 26, № 4. P. 043504.
192. Duan J. et al. The penetration of reactive oxygen and nitrogen species across the stratum corneum // *Plasma Processes & Polymers*. 2020. Vol. 17, № 10. P. 2000005.
193. Takeda S. et al. Intraperitoneal Administration of Plasma-Activated Medium: Proposal of a Novel Treatment Option for Peritoneal Metastasis From Gastric Cancer // *Ann Surg Oncol*. 2017. Vol. 24, № 5. P. 1188–1194.
194. Bakhtiyari-Ramezani M., Nasiri M., Baniasadi M. Helium and argon cold plasma effects on the 4T1 cancer cells and a triple negative mouse model of breast cancer // *Sci Rep*. 2025. Vol. 15, № 1. P. 10569.
195. Guo B. et al. Trident cold atmospheric plasma blocks three cancer survival pathways to overcome therapy resistance // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2021. Vol. 118, № 51. P. e2107220118.
196. Zhou X. et al. *In vivo* Pen: A novel plasma source for *in vivo* cancer treatment // *J. Cancer*. 2020. Vol. 11, № 8. P. 2273–2282.
197. Wu T. et al. Multiple RONS-Loaded Plasma-Activated Ice Microneedle Patches for Transdermal Treatment of Psoriasis // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2024. Vol. 16, № 35. P. 46123–46132.
198. Vandamme M. et al. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma // *Intl Journal of Cancer*. 2012. Vol. 130, № 9. P. 2185–2194.
199. Walk R.M. et al. Cold atmospheric plasma for the ablative treatment of neuroblastoma // *Journal of Pediatric Surgery*. 2013. Vol. 48, № 1. P. 67–73.
200. Vaquero J. et al. Cold-Atmospheric Plasma Induces Tumor Cell Death in Preclinical In Vivo and In Vitro Models of Human Cholangiocarcinoma // *Cancers*. 2020. Vol. 12, № 5. P. 1280.
201. Jung J.-M. et al. Anticancer Effect of Cold Atmospheric Plasma in Syngeneic Mouse Models of Melanoma and Colon Cancer // *Molecules*. 2023. Vol. 28, № 10. P. 4171.
202. Yao H. et al. Anti-Tumor Effect of Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma-Activated Medium on Synovial Sarcoma: An In Vitro and In Vivo Study // *Biomedicines*. 2025. Vol. 13, № 3. P. 534.

203. Holanda A.G.A. et al. Use of Cold Atmospheric Plasma in the Treatment of Squamous Cell Carcinoma: in vitro Effects and Clinical Application in Feline Tumors: A Pilot Study // Topics in Companion Animal Medicine. 2023. Vol. 53–54. P. 100773.
204. Tanaka H. et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer's solution for anti-tumor effects // Sci Rep. 2016. Vol. 6, № 1. P. 36282.
205. Sato K. et al. Ferroptosis induced by plasma-activated Ringer's lactate solution prevents oral cancer progression // Oral Diseases. 2024. Vol. 30, № 6. P. 3912–3924.
206. Metelmann H.-R. et al. Clinical experience with cold plasma in the treatment of locally advanced head and neck cancer // Clinical Plasma Medicine. 2018. Vol. 9. P. 6–13.
207. Canady J. et al. The First Cold Atmospheric Plasma Phase I Clinical Trial for the Treatment of Advanced Solid Tumors: A Novel Treatment Arm for Cancer // Cancers. 2023. Vol. 15, № 14. P. 3688.
208. Primer designing tool [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (дата обращения: 16.04.2025).
209. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. Vol. 30, № 15. P. 2114–2120.
210. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // Nat Methods. 2012. Vol. 9, № 4. P. 357–359.
211. Dobin A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner // Bioinformatics. 2013. Vol. 29, № 1. P. 15–21.
212. Hartley S.W., Mullikin J.C. QoRTs: a comprehensive toolset for quality control and data processing of RNA-Seq experiments // BMC Bioinformatics. 2015. Vol. 16, № 1. P. 224.
213. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // Genome Biol. 2014. Vol. 15, № 12. P. 550.
214. Chen S. et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor // Bioinformatics. 2018. Vol. 34, № 17. P. i884–i890.
215. Bray N.L. et al. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification // Nat Biotechnol. 2016. Vol. 34, № 5. P. 525–527.
216. Xie Z. et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr // Current Protocols. 2021. Vol. 1, № 3. P. e90.
217. Xie F. et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs // Plant Mol Biol. 2012. Vol. 80, № 1. P. 75–84.
218. Untergasser A. et al. Web-based LinRegPCR: application for the visualization and analysis of (RT)-qPCR amplification and melting data // BMC Bioinformatics. 2021. Vol. 22, № 1. P. 398.

219. 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.
220. Gibson A.R. et al. Interactions of a Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Effluent with PC-3 Prostate Cancer Cells // *Plasma Processes & Polymers*. 2014. Vol. 11, № 12. P. 1142–1149.
221. Ye H. et al. Protein S -Nitrosation: Biochemistry, Identification, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Applications // *J. Med. Chem.* 2022. Vol. 65, № 8. P. 5902–5925.
222. Matsuo Y., Yodoi J. Extracellular thioredoxin: A therapeutic tool to combat inflammation // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2013. Vol. 24, № 4. P. 345–353.
223. Yusupov M. et al. Atomic scale simulation of H₂ O₂ permeation through aquaporin: toward the understanding of plasma cancer treatment // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2018. Vol. 51, № 12. P. 125401.
224. Gęgotek A., Skrzydlewska E. Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products // *Chemistry and Physics of Lipids*. 2019. Vol. 221. P. 46–52.
225. Liu J., Kang R., Tang D. ESCRT-III-mediated membrane repair in cell death and tumor resistance // *Cancer Gene Ther.* 2021. Vol. 28, № 1–2. P. 1–4.
226. Olmos Y. The ESCRT Machinery: Remodeling, Repairing, and Sealing Membranes // *Membranes*. 2022. Vol. 12, № 6. P. 633.
227. Li H. et al. Critical role of peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes following oxidative stress // *Free Radical Biology and Medicine*. 2015. Vol. 87. P. 356–365.
228. Lachmann A. et al. Massive mining of publicly available RNA-seq data from human and mouse // *Nat Commun.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 1366.
229. Du Y. et al. Evaluation of STAR and Kallisto on Single Cell RNA-Seq Data Alignment // *G3 Genes|Genomes|Genetics*. 2020. Vol. 10, № 5. P. 1775–1783.
230. Schaarschmidt S. et al. Evaluation of Seven Different RNA-Seq Alignment Tools Based on Experimental Data from the Model Plant *Arabidopsis thaliana* // *IJMS*. 2020. Vol. 21, № 5. P. 1720.
231. Costa-Silva J., Domingues D., Lopes F.M. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool // *PLoS ONE* / ed. Wei Z. 2017. Vol. 12, № 12. P. e0190152.
232. Wang X. et al. HKDC1 promotes the tumorigenesis and glycolysis in lung adenocarcinoma via regulating AMPK/mTOR signaling pathway // *Cancer Cell Int.* 2020. Vol. 20, № 1. P. 450.

233. Czegle I. et al. The Role of Genetic Mutations in Mitochondrial-Driven Cancer Growth in Selected Tumors: Breast and Gynecological Malignancies // *Life*. 2023. Vol. 13, № 4. P. 996.
234. Suhane S., Berel D., Ramanujan V.K. Biomarker signatures of mitochondrial NDUF53 in invasive breast carcinoma // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011. Vol. 412, № 4. P. 590–595.
235. Suzuki C. et al. Identification of COX17 as a therapeutic target for non-small cell lung cancer // *Cancer Res*. 2003. Vol. 63, № 21. P. 7038–7041.
236. Zhang C. et al. Cox15 is a novel oncogene that required for lung cancer cell proliferation // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2021. Vol. 578. P. 70–76.
237. Ma L. et al. Targeting carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A) induces ferroptosis and synergizes with immunotherapy in lung cancer // *Sig Transduct Target Ther*. 2024. Vol. 9, № 1. P. 64.
238. Liang K. Mitochondrial CPT1A: Insights into structure, function, and basis for drug development // *Front. Pharmacol*. 2023. Vol. 14. P. 1160440.
239. Fahrman J.F. et al. Mutational Activation of the NRF2 Pathway Upregulates Kynureninase Resulting in Tumor Immunosuppression and Poor Outcome in Lung Adenocarcinoma // *Cancers*. 2022. Vol. 14, № 10. P. 2543.
240. León-Letelier R.A. et al. Kynureninase Upregulation Is a Prominent Feature of NRF2-Activated Cancers and Is Associated with Tumor Immunosuppression and Poor Prognosis // *Cancers*. 2023. Vol. 15, № 3. P. 834.
241. Ao L. et al. Targeting GFPT2 to reinvigorate immunotherapy in EGFR-mutated NSCLC. 2024.
242. Lou T.-F. et al. Cancer-Specific Production of N-Acetylaspartate via NAT8L Overexpression in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Potential as a Circulating Biomarker // *Cancer Prevention Research*. 2016. Vol. 9, № 1. P. 43–52.
243. Huang Z. et al. SMOX expression predicts the prognosis of non-small cell lung cancer // *Ann Transl Med*. 2021. Vol. 9, № 13. P. 1048–1048.
244. Expression of RIMKLB in cancer - Summary - The Human Protein Atlas [Электронный ресурс]. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000166532-RIMKLB/cancer> (дата обращения: 18.04.2025).
245. Vantaku V. et al. Epigenetic loss of AOX1 expression via EZH2 leads to metabolic deregulations and promotes bladder cancer progression // *Oncogene*. 2020. Vol. 39, № 40. P. 6265–6285.

246. Xiong L. et al. Expression of AOX1 Predicts Prognosis of Clear Cell Renal Cell Carcinoma // *Front. Genet.* 2021. Vol. 12. P. 683173.
247. Robinson A.D. et al. Collagen modifying enzyme P4HA1 is overexpressed and plays a role in lung adenocarcinoma // *Translational Oncology.* 2021. Vol. 14, № 8. P. 101128.
248. Ning Y. et al. Overexpression of P4HA1 associates with poor prognosis and promotes cell proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma // *J. Cancer.* 2021. Vol. 12, № 22. P. 6685–6694.
249. Wang Y. et al. BCKDK alters the metabolism of non-small cell lung cancer // *Transl Lung Cancer Res.* 2021. Vol. 10, № 12. P. 4459–4476.
250. Yu M. et al. BCAT1 promotes lung adenocarcinoma progression through enhanced mitochondrial function and NF- κ B pathway activation // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2022. Vol. 23, № 9. P. 760–769.
251. Expression of BCKDHB in cancer - Summary - The Human Protein Atlas [Электронный ресурс]. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000083123-BCKDHB/cancer#ihc> (дата обращения: 18.04.2025).
252. Expression of BCAT1 in cancer - Summary - The Human Protein Atlas [Электронный ресурс]. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000060982-BCAT1/cancer#ihc> (дата обращения: 18.04.2025).
253. He N. et al. Integrated Analysis of Transcriptomes of Cancer Cell Lines and Patient Samples Reveals STK11/LKB1–Driven Regulation of cAMP Phosphodiesterase-4D // *Molecular Cancer Therapeutics.* 2014. Vol. 13, № 10. P. 2463–2473.
254. Chiarella A.M. et al. Extracellular ATP and Adenosine in Cancer Pathogenesis and Treatment // *Trends in Cancer.* 2021. Vol. 7, № 8. P. 731–750.
255. Tavleeva M.M. et al. Effects of Antioxidant Gene Overexpression on Stress Resistance and Malignization In Vitro and In Vivo: A Review // *Antioxidants.* 2022. Vol. 11, № 12. P. 2316.
256. Lemons J.M.S. et al. Quiescent Fibroblasts Exhibit High Metabolic Activity // *PLoS Biol* / ed. Goodell M.A. 2010. Vol. 8, № 10. P. e1000514.
257. Huang M. et al. Advances in the role of the GADD45 family in neurodevelopmental, neurodegenerative, and neuropsychiatric disorders // *Front. Neurosci.* 2024. Vol. 18. P. 1349409.
258. Deleyto-Seldas N., Efeyan A. The mTOR–Autophagy Axis and the Control of Metabolism // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Vol. 9. P. 655731.
259. Pan Y.-X., Chen H., Kilberg M.S. Interaction of RNA-binding Proteins HuR and AUF1 with the Human ATF3 mRNA 3'-Untranslated Region Regulates Its Amino Acid

Limitation-induced Stabilization // Journal of Biological Chemistry. 2005. Vol. 280, № 41. P. 34609–34616.

260. Vu T.T.M., Varshavsky A. The ATF3 Transcription Factor Is a Short-Lived Substrate of the Arg/N-Degron Pathway // Biochemistry. 2020. Vol. 59, № 30. P. 2796–2812.

261. Zumbrun S.D., Hoffman B., Liebermann D.A. Distinct mechanisms are utilized to induce stress sensor *gadd45b* by different stress stimuli // J of Cellular Biochemistry. 2009. Vol. 108, № 5. P. 1220–1231.

262. Mahaseth T., Kuzminov A. Prompt repair of hydrogen peroxide-induced DNA lesions prevents catastrophic chromosomal fragmentation // DNA Repair. 2016. Vol. 41. P. 42–53.

263. Chen J. et al. Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage // Nucleic Acids Research. 2008. Vol. 36, № 11. P. 3781–3790.

264. Karakostis K. et al. The DNA damage sensor ATM kinase interacts with the p53 mRNA and guides the DNA damage response pathway // Mol Cancer. 2024. Vol. 23, № 1. P. 21.

265. Rogakou E.P. et al. Initiation of DNA Fragmentation during Apoptosis Induces Phosphorylation of H2AX Histone at Serine 139 // Journal of Biological Chemistry. 2000. Vol. 275, № 13. P. 9390–9395.

266. Ward I.M., Chen J. Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress // Journal of Biological Chemistry. 2001. Vol. 276, № 51. P. 47759–47762.

267. Magnussen H.M. et al. Structural basis for DNA damage-induced phosphoregulation of MDM2 RING domain // Nat Commun. 2020. Vol. 11, № 1. P. 2094.

268. Riley M.F., Lozano G. The Many Faces of MDM2 Binding Partners // Genes & Cancer. 2012. Vol. 3, № 3–4. P. 226–239.

269. Osowski C.M., Urano F. Measuring ER Stress and the Unfolded Protein Response Using Mammalian Tissue Culture System // Methods in Enzymology. Elsevier, 2011. Vol. 490. P. 71–92.

270. Wang Y. et al. Endoplasmic Reticulum Stress Response of Trabecular Meshwork Stem Cells and Trabecular Meshwork Cells and Protective Effects of Activated PERK Pathway // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2019. Vol. 60, № 1. P. 265.

271. Frottin F. et al. The nucleolus functions as a phase-separated protein quality control compartment // Science. 2019. Vol. 365, № 6451. P. 342–347.

272. Holczer M. et al. A Comprehensive Systems Biological Study of Autophagy-Apoptosis Crosstalk during Endoplasmic Reticulum Stress // *BioMed Research International*. 2015. Vol. 2015. P. 1–12.
273. Denton D., Kumar S. Autophagy-dependent cell death // *Cell Death Differ*. 2019. Vol. 26, № 4. P. 605–616.
274. Yoshikawa N. et al. Plasma-activated medium promotes autophagic cell death along with alteration of the mTOR pathway // *Sci Rep*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 1614.
275. Conway G.E. et al. Cold Atmospheric Plasma induces accumulation of lysosomes and caspase-independent cell death in U373MG glioblastoma multiforme cells // *Sci Rep*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 12891.
276. Lee Y. et al. Keap1/Cullin3 Modulates p62/SQSTM1 Activity via UBA Domain Ubiquitination // *Cell Reports*. 2017. Vol. 19, № 1. P. 188–202.
277. Ichimura Y. et al. Phosphorylation of p62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy // *Molecular Cell*. 2013. Vol. 51, № 5. P. 618–631.
278. Milani M. et al. The Role of ATF4 Stabilization and Autophagy in Resistance of Breast Cancer Cells Treated with Bortezomib // *Cancer Research*. 2009. Vol. 69, № 10. P. 4415–4423.
279. Liu T. et al. Combination of an Autophagy Inducer and an Autophagy Inhibitor: A Smarter Strategy Emerging in Cancer Therapy // *Front. Pharmacol*. 2020. Vol. 11. P. 408.
280. Jia B. et al. Autophagy inhibitor chloroquine induces apoptosis of cholangiocarcinoma cells via endoplasmic reticulum stress // *Oncol Lett*. 2018.
281. Changotra H. et al. ATG5: A central autophagy regulator implicated in various human diseases // *Cell Biochemistry & Function*. 2022. Vol. 40, № 7. P. 650–667.
282. Redmann M. et al. Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons // *Redox Biology*. 2017. Vol. 11. P. 73–81.
283. Chen X. et al. Mitochondrial-Dependent and Independent Functions of PINK1 // *Front. Cell Dev. Biol*. 2022. Vol. 10. P. 954536.
284. Zerihun M., Sukumaran S., Qvit N. The Drp1-Mediated Mitochondrial Fission Protein Interactome as an Emerging Core Player in Mitochondrial Dynamics and Cardiovascular Disease Therapy // *IJMS*. 2023. Vol. 24, № 6. P. 5785.
285. Ikeda Y. et al. Endogenous Drp1 Mediates Mitochondrial Autophagy and Protects the Heart Against Energy Stress // *Circulation Research*. 2015. Vol. 116, № 2. P. 264–278.
286. Twig G., Shirihai O.S. The Interplay Between Mitochondrial Dynamics and Mitophagy // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011. Vol. 14, № 10. P. 1939–1951.

287. Ghosh S. et al. PINK1 insufficiency can be exploited as a specific target for drug combinations inducing mitochondrial pathology-mediated cell death in gastric adenocarcinoma // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2024. Vol. 759. P. 110110.
288. Xu S. et al. Cold atmospheric plasma-activated Ringer's solution inhibits the proliferation of osteosarcoma cells through the mitochondrial apoptosis pathway // Oncol Rep. 2020.
289. Yazdani Z. et al. Combined Effect of Cold Atmospheric Plasma and Curcumin in Melanoma Cancer // BioMed Research International / ed. Acuña-Castillo C. 2021. Vol. 2021, № 1. P. 1969863.
290. Welz C. et al. Cold Atmospheric Plasma: A Promising Complementary Therapy for Squamous Head and Neck Cancer // PLoS ONE / ed. Hamblin M. 2015. Vol. 10, № 11. P. e0141827.
291. Brigelius-Flohé R., Flohé L. Regulatory Phenomena in the Glutathione Peroxidase Superfamily // Antioxidants & Redox Signaling. 2020. Vol. 33, № 7. P. 498–516.
292. Weaver K., Skouta R. The Selenoprotein Glutathione Peroxidase 4: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities // Biomedicines. 2022. Vol. 10, № 4. P. 891.
293. Cell line - GPX4 - The Human Protein Atlas [Электронный ресурс]. URL: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000167468-GPX4/cell+line#lung_cancer (дата обращения: 14.05.2025).
294. Li Z. et al. Ribosome stalling during selenoprotein translation exposes a ferroptosis vulnerability // Nat Chem Biol. 2022. Vol. 18, № 7. P. 751–761.
295. Zhang Y. et al. mTORC1 couples cyst(e)ine availability with GPX4 protein synthesis and ferroptosis regulation // Nat Commun. 2021. Vol. 12, № 1. P. 1589.
296. Deng L. et al. Depletion of the N6-Methyladenosine (m6A) reader protein IGF2BP3 induces ferroptosis in glioma by modulating the expression of GPX4 // Cell Death Dis. 2024. Vol. 15, № 3. P. 181.
297. Huang B. et al. Palmitoylation-dependent regulation of GPX4 suppresses ferroptosis // Nat Commun. 2025. Vol. 16, № 1. P. 867.
298. Wu P. et al. Organelle-Specific Mechanisms in Crosstalk between Apoptosis and Ferroptosis // Oxidative Medicine and Cellular Longevity / ed. Malaguti M. 2023. Vol. 2023. P. 1–14.
299. Qiu Y. et al. Interplay of ferroptotic and apoptotic cell death and its modulation by BH3-mimetics. 2024.

300. Schweigert I.V. et al. Characteristics of Cold Atmospheric Plasma Jet when Excited by Sinusoidal and Positive Pulse Voltages for Medical Applications // Plasma Phys. Rep. 2023. Vol. 49, № 5. P. 595–601.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Состав потока холодной плазменной струи, используемой в экспериментальной части работы для воздействия на биомишени

Состав потока плазмы исследовался сотрудниками лаборатории мощных газовых лазеров Института физики полупроводников им. Р.А. Ржанова СО РАН методом оптической эмиссионной спектроскопии с использованием спектрометра «Колибри-2» (ООО «ВМК-Оптоэлектроника», Россия) в диапазоне длин волн 200-750 нм с разрешением 0,5 нм. При помощи данного метода регистрируются спектры, соответствующие переходам частиц из возбужденного состояния либо в базовое, либо в другое возбужденное состояние с меньшей энергией. Например, для гелия переход из состояния $1s3s$ ($3s^3S$) в состояние $1s2p$ ($2p^3P^0$) сопровождается испусканием фотона с длиной волны, равной 706,5 нм.

Характерный эмиссионный спектр плазменной струи в гелии, генерированной при синусоидальном типе напряжения с амплитудой 3,5 кВ, частотой 52 кГц и скоростью газа 9 л/мин, представлен на рисунке А.1, регистрация проводилась на расстоянии 5 мм от сопла.

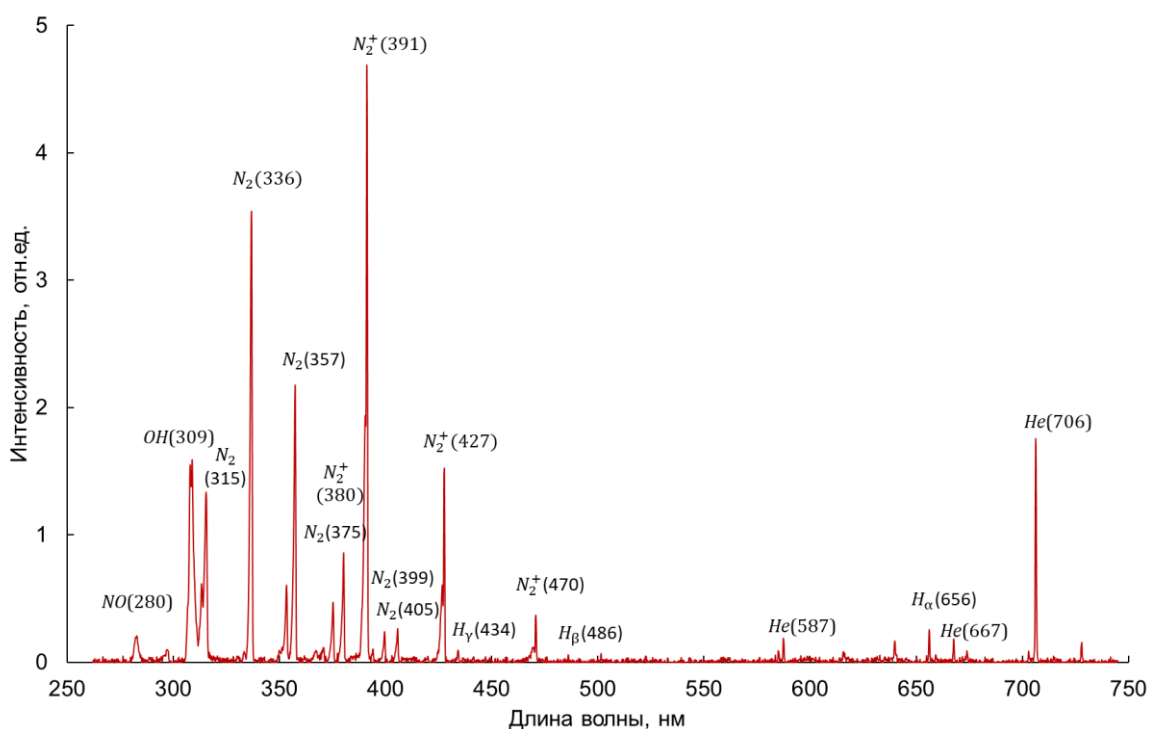


Рисунок А.1 – Эмиссионный спектр струи плазмы в гелии, зарегистрированный на расстоянии 5 мм от сопла газоразрядной камеры. Длины волн округлены до ближайшего целого числа.

Линии с наибольшей интенсивностью соответствуют переходам, характерным для He (587, 667, 706 нм), N₂ (315, 336, 357, 375, 399, 405 нм), N₂⁺ (380, 391, 427, 470 нм), •ОН (309 нм), NO (280 нм), а также атомарного водорода (H_α: 656 нм, H_β: 486 нм, H_γ: 434 нм). Стоит отметить, что спектральный состав потока не зависит от типа напряжения: синусоидального/импульсного, а также от типа мишени: пластиковая или керамическая пластина, вода, культуральная среда, кожа. При изменении параметров разряда, состава газа и мишени варьируют только относительные интенсивности тех или иных линий.

Вариации относительных интенсивностей заметны также и по длине струи (Рисунок А.2).

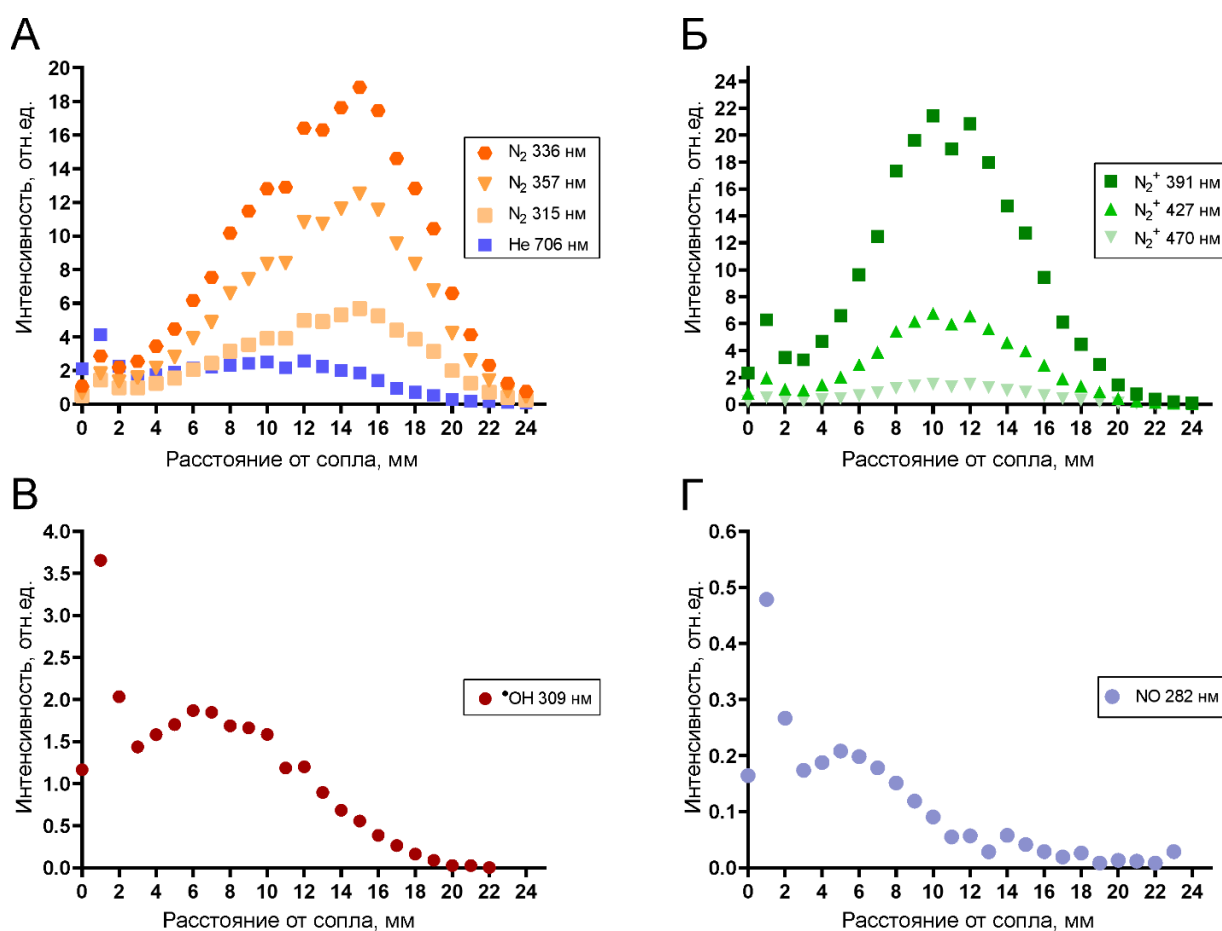


Рисунок А.2 – Изменение по длине плазменной струи интенсивностей эмиссионных линий: А – молекулярного азота, Б – ионизированного молекулярного азота, В – гидроксил-радикала, Г – монооксида азота.

На выходе из газоразрядной камеры (0-2 мм от сопла) наблюдаются наибольшие интенсивности линий, соответствующих переходам метастабильных состояний гелия (Рисунок А.2 А), гидроксил-радикалов и монооксида азота. На расстоянии 4-12 мм видно увеличение содержания ионизированной формы молекулярного азота (Рисунок А.2 Б) и

повторный рост с дальнейшим снижением содержания гидроксил-радикала и монооксида азота (Рисунок А.2 В, Г). Доля молекулярного азота увеличивается ближе к концу струи, что, вероятно, обусловлено диффузией азота воздуха в струю.

Обработка водных сред позволяет достичь увеличения содержания гидроксил-радикалов в потоке плазмы в области контакта с мишенью (Рисунок А.3).

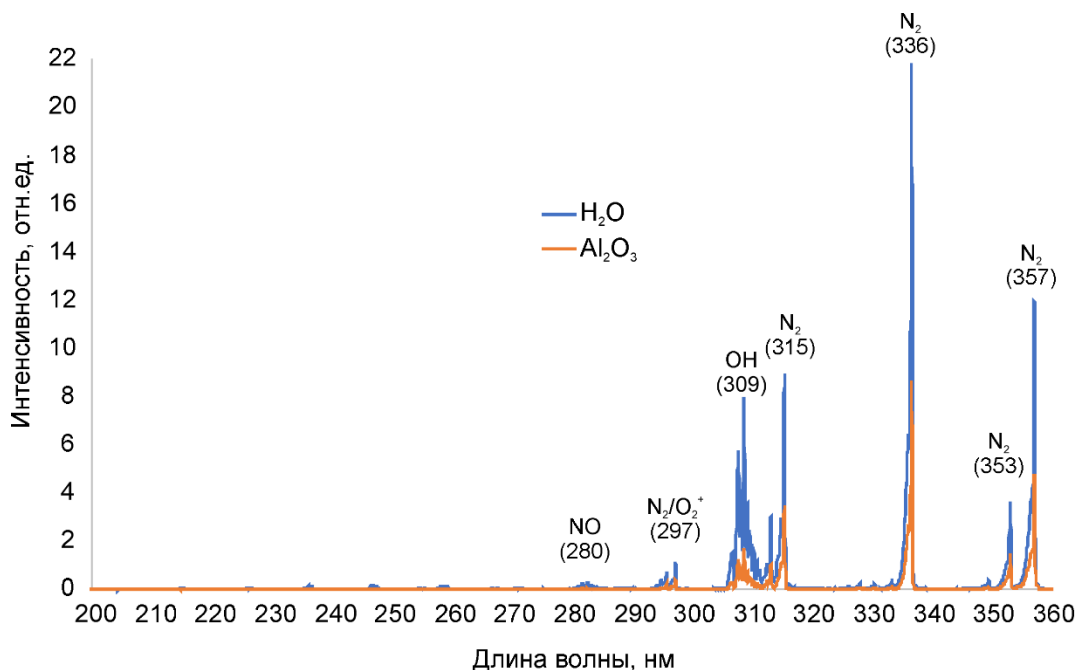


Рисунок А.3 – Эмиссионный спектр струи плазмы в гелии над поверхностью керамической пластины и над поверхностью воды. Представлена УФ-область спектра.

Интересно, что вместе с увеличением интенсивности линии, соответствующей гидроксил-радикалу, увеличиваются и интенсивности линий, соответствующих переходам молекулярного азота (315, 336, 353, 357 нм).

Зависимость жизнеспособности клеток от количества среды в лунке планшета

Клетки, растущие в 96-луночных планшетах, обрабатывали в течение 1 мин либо ХПС в синусоидальном режиме (3,5 кВ, 52 кГц, гелий, 9 л/мин), либо потоком гелия (9 л/мин). Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ через 24 ч после обработки (Рисунок А.4).

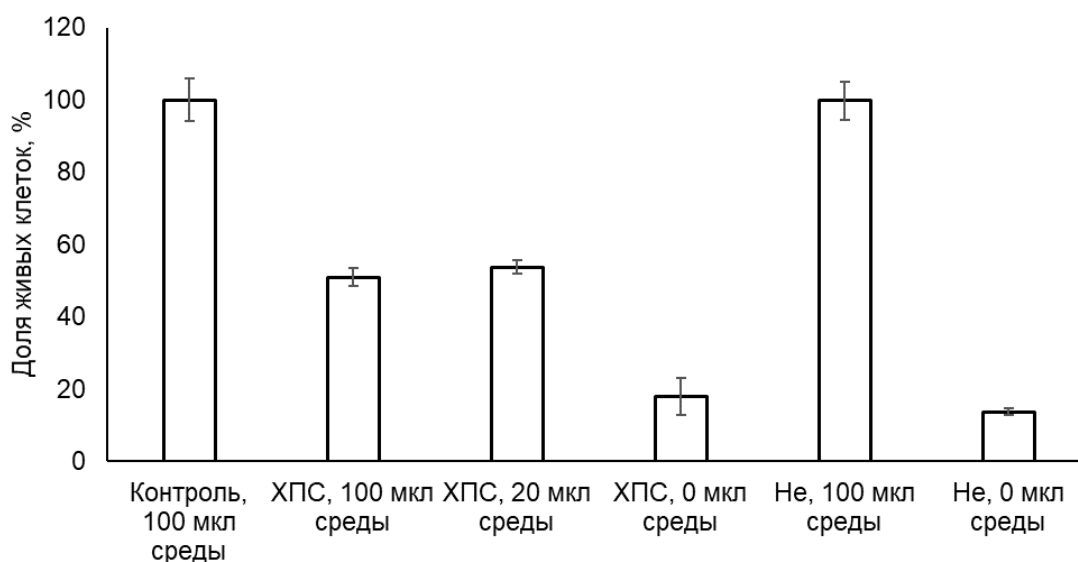


Рисунок А.4 – Жизнеспособность клеток после обработки ХПС или струей гелия при объеме среды, равном 100, 20 или 0 мкл. Данные МТТ теста, проведенного через 24 ч после обработки, представлены как среднее значение трех повторов $\pm$ стандартное отклонение. «Контроль» – необработанные клетки, «ХПС» - клетки, обработанные в течение 1 мин ХПС в синусоидальном режиме генерации, «He» - клетки, обработанные струей гелия без приложенного напряжения. Указан объем среды в лунке в момент обработки: «100 мкл» - полный объем среды; «20 мкл» - клетки покрыты 20 мкл среды, 80 мкл отобраны непосредственно перед обработкой, после обработки добавлено 80 мкл свежей среды; «0 мкл» - непосредственно перед обработкой из лунок отобран весь объем среды, после обработки добавлено 100 мкл свежей среды.

Видно, что при объеме среды 20 или 100 мкл наблюдается одинаковая цитотоксичность обработки. В случае клеток, не покрытых средой, наблюдается полная гибель клеток как при обработке ХПС, так и при обработке струей гелия без напряжения. Клетки, покрытые 100 мкл среды и обработанные струей гелия, сохраняют жизнеспособность на уровне необработанных клеток.

Определение продолжительности обработки клеток, растущих в лунках 6-луночного планшета

Первоначальные эксперименты по подбору параметров и оценке жизнеспособности клеток проводились на клетках, растущих в лунках 96-луночного планшета. Однако для проведения экспериментов по выяснению механизма ответа клеток на обработку необходимо обрабатывать десятки и сотни тысяч клеток. Для такой обработки клетки

высаживали в 6-луночные планшеты. Подбирали плотность клеток и время обработки ХПС. Клетки высаживали в лунки 6-луночного планшета в количестве, указанном в таблице А.1.

Таблица А.1 – Количество клеток, высаживаемых в лунки 6-луночного планшета для обработки ХПС

Культура клеток	Количество клеток в лунке 96-луночного планшета	Количество клеток в лунке 6-луночного планшета
A-549	5 тыс.	210 тыс.
Wi-38	10 тыс.	310 тыс.
NCI-H23	5 тыс.	250 тыс.
MRC-5	5 тыс.	380 тыс.

Продолжительность обработки подбирали с помощью оценки жизнеспособности клеток методом МТТ-теста (Рисунок А.5).

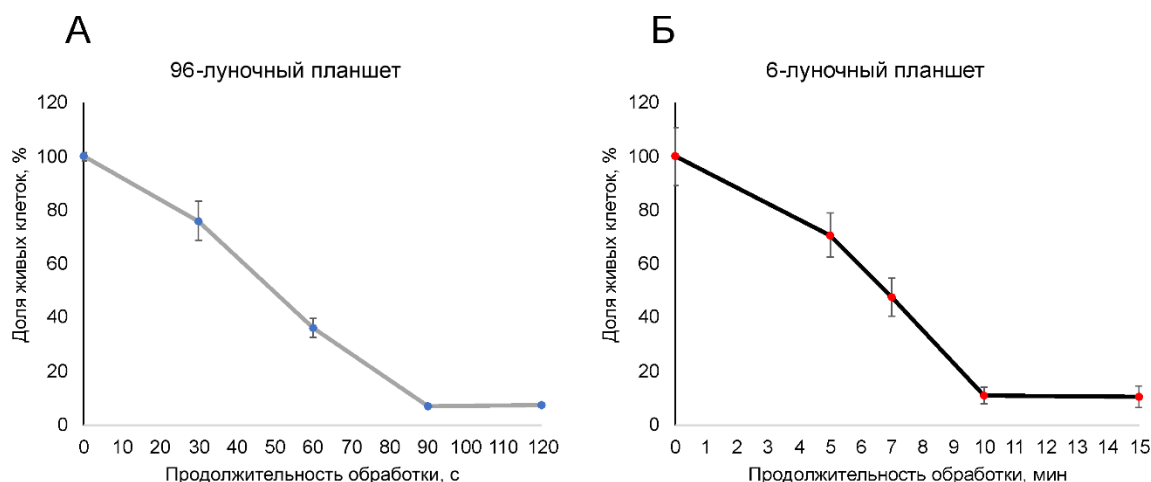


Рисунок А.5 – Сравнение цитотоксического эффекта ХПС при обработке клеток аденокарциномы легкого А-549, растущих в лунках 96-луночного (А) и 6-луночного (Б) планшета. Результаты МТТ-теста представлены как среднее значение, рассчитанное по трем повторам $\pm$ стандартное отклонение.

При переходе на 6-луночные планшеты наблюдалось нелинейное увеличение продолжительности обработки, необходимой для достижения цитотоксического эффекта, сопоставимого с таковой в 96-луночных планшетах. В работе считали эквивалентными продолжительности обработки: 30 с/лунку 96-луночного планшета и 5 мин/лунку 6-луночного планшета; 60 с/лунку 96-луночного планшета и 7 мин/лунку 6-луночного планшета; 120 с/лунку 96-луночного планшета и 10 мин/лунку 6-луночного планшета.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.1 – Праймеры для проведения ОТ-ПЦР РВ

Символ гена	Последовательность праймера	Длина продукта, п.о.	Номер экзона на референсной последовательности*
<i>HPRT1</i>	F: 5'-CTCGAGATGTGATGAAGGAG-3'	258	3
	R: 5'-TATCTTCCACAATCAAGACATT-3'		5/6**
<i>GAPDH</i>	F: 5'- GAAGGTGAAGGTCCGAGT-3'	226	2
	R: 5'- GAAGATGGTGATGGGATTTC - 3'		4
<i>KLF4</i>	F: 5'-GGGAGAAGACACTGCGTCAA-3'	229	2
	R: 5'-TCCAGGTCCAGGAGATCGTT-3'		3
<i>FOS</i>	F: 5'-GCGTTGTGAAGACCATGACAG-3'	165	2
	R: 5'-GTGTATCAGTCAGCTCCCTCC-3'		3
<i>ATF3</i>	F: 5'-TTTGCTAACCTGACGCCCTT-3'	218	2
	R: 5'-TTGTTTCGGCACTTTGCAGC-3'		3
<i>GADD45B</i>	F: 5'-GTACGAGTCGGCCAAGTTGA-3'	263	2
	R: 5'-CCGTGTGAGGGTTCGTGAC-3'		3/4
<i>GPX4</i>	F: 5'-GTGAGGCAAGACCGAAGTA -3'	275	3
	R: 5'-TCCACTTGATGGCATTTCCTCC-3'		4/5
<i>B2M</i>	F: 5'-TGGGTTTCATCCATCCGACA-3'	245	2
	R: 5'-CGGCATCTTCAAACCTCCAT-3'		3/4
<i>ATF4</i>	F: 5'-TCCAACAACAGCAAGGAGGAT-3'	246	1/2
	R: 5'-GTCGGGTTTTGTAAACTTTCTGG-3'		2

Продолжение таблицы Б.1

Символ гена	Последовательность праймера	Длина продукта, п.о.	Номер экзона на референсной последовательности*
<i>DDIT3</i>	F: 5'-CAGCCACTCCCCATTATCCT-3'	215	3
	R: 5'-GGTGAAGATTTTTGATTCTTCCTCT-3'		3/4
<i>SQSTM1</i>	F: 5'-AGGATGACATCTTCCGAATCTAC-3'	272	2
	R: 5'-GTGCGAGAAGCCCTCAGAC-3'		3/4
<i>MAP1LC3B</i>	F: 5'-GACTTATTCGAGAGCAGCATC-3'	229	2
	R: 5'-TCTGAGATTGGTGTGGAGAC-3'		4

*В качестве референсных использованы последовательности вариантов транскриптов с номером 1 в базе данных NCBI Nucleotide.

**Символ «/» обозначает границу экзонов.

Таблица Б.2 – Количество прочтений в каждом экспериментальном образце

Линия клеток	Продолжительность обработки ХПС, с	Время после обработки ХПС, ч	Код образца	Количество прочтений, млн	Количество биологических повторов	Количество прочтений на экспериментальную точку, млн
А-549	0	0	A1	11,8	2	21,2
			A2	9,4		
	60	3	A3	12,4	2	22,6
			A4	10,2		
	120	3	A5	11,5	2	22,1
			A6	10,6		
	60	24	A7	10,9	2	21,5
			A8	10,6		

Продолжение таблицы Б.2

Линия клеток	Продолжи- тельность обработки ХПС, с	Время после обработ- ки ХПС, ч	Код образца	Количество прочтений, млн	Количество биологичес- ких повторов	Количество прочтений на эксперимен- тальную точку, млн
Wi-38	0	0	W1	12,2	2	23,6
			W2	11,4		
	60	3	W3	12,2	2	24,6
			W4	12,4		
	120	3	W5	12,2	2	24,4
			W6	12,2		
	60	24	W7	12,6	2	24,9
			W8	12,3		

Таблица Б.3 – Результаты фильтрации прочтений алгоритмом fastp

Код образца	Прочтения низкого качества (<Q20), шт.	Прочтения с большим количеством повторов N, шт.	Прочтения длиной менее 30 нт, шт.	Прочтения, прошедшие фильтрацию, шт.	Доля прочтений, прошедших фильтрацию, %
A1	218369	263	21971	11521307	98,0
A2	173424	179	15033	9174569	98,0
A3	253995	239	20090	12100192	97,8
A4	215891	196	22888	10003531	97,7
A5	246287	210	19455	11235763	97,7
A6	237425	199	43424	10348415	97,4
A7	222956	239	24752	10683509	97,7
A8	287165	163	2110	10263447	97,3
W1	249544	235	2681	11961765	97,9
W2	235463	222	2257	11120276	97,9
W3	245538	239	2558	11917131	98,0
W4	229275	228	1612	12135675	98,1

Продолжение таблицы Б.3

Код образца	Прочтения низкого качества (<Q20), шт.	Прочтения с большим количеством повторов N, шт.	Прочтения длиной менее 30 нт, шт.	Прочтения, прошедшие фильтрацию, шт.	Доля прочтений, прошедших фильтрацию, %
W5	239311	253	1510	11951794	98,0
W6	231607	241	1580	11967848	98,1
W7	234733	269	1657	12347114	98,1
W8	243859	238	1457	12076308	98,0

Таблица Б.4 – Результаты псевдовыравнивания прочтений на транскриптом человека

Код образца	Обработано прочтений, шт.	Количество псевдовыравненных прочтений, шт.	Доля псевдовыравненных прочтений, %
A1	11521307	10401972	90,3
A2	9174569	8298677	90,5
A3	12100192	10774084	89,0
A4	10003531	8784705	87,8
A5	11235763	10031179	89,3
A6	10348415	8911956	86,1
A7	10683509	9291142	87,0
A8	10263447	8173513	79,6
W1	11961765	10769120	90,0
W2	11120276	9972474	89,7
W3	11917131	10703791	89,8
W4	12135675	10841796	89,3
W5	11951794	10718036	89,7
W6	11967848	10723281	89,6
W7	12347114	11038798	89,4
W8	12076308	10840110	89,8

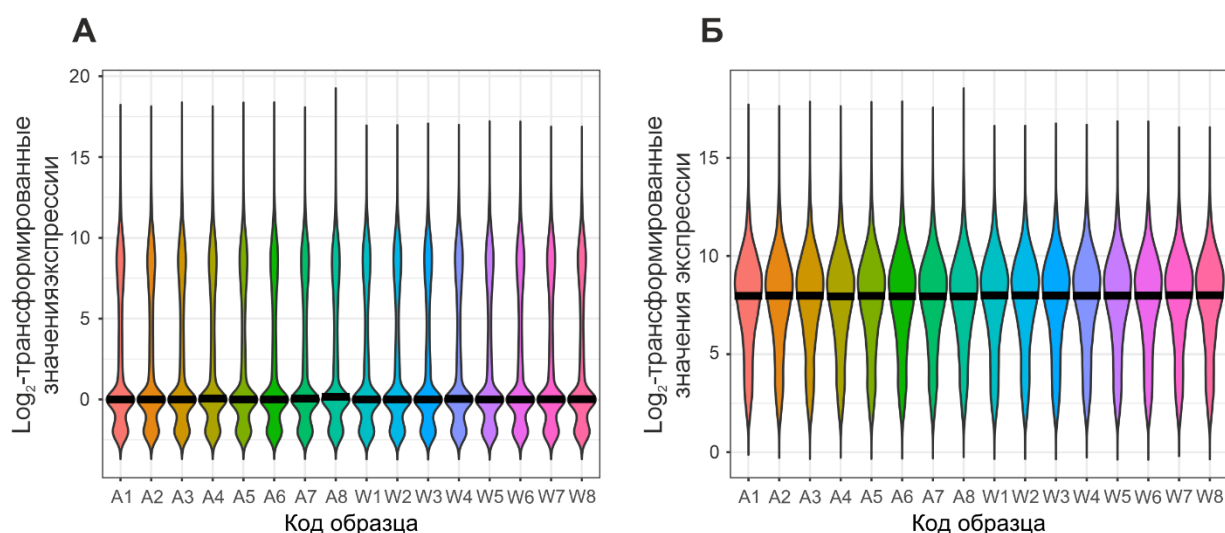


Рисунок Б.1 – Результаты фильтрации данных о количестве картированных прочтений

Таблица Б.5 – Метаболические пути, использованные для изучения вовлеченности в них генов, экспрессия которых отличалась в образцах опухолевых и здоровых клеток

Идентификатор в базе данных KEGG	Термин базы данных KEGG, соответствующий метаболическому пути
hsa00010	glycolysis
hsa00020	TCA cycle
hsa00190	Oxidative phosphorylation
hsa00030	Pentose phosphate pathway
hsa00620	Pyruvate metabolism
hsa00061	Fatty acid biosynthesis
hsa00062	Fatty acid elongation
hsa00071	Fatty acid degradation
hsa00480	Glutathione metabolism
hsa00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism
hsa00260	Glycine, serine and threonine metabolism
hsa00270	Cysteine and methionine metabolism
hsa00280	Valine, leucine and isoleucine degradation
hsa00290	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis
hsa00310	Lysine degradation
hsa00220	Arginine biosynthesis
hsa00330	Arginine and proline metabolism
hsa00340	Histidine metabolism
hsa00350	Tyrosine metabolism
hsa00360	Phenylalanine metabolism
hsa00380	Tryptophan metabolism
hsa00400	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway
hsa00230	Purine metabolism
hsa00240	Pyrimidine metabolism

Таблица Б.6 – Изменение экспрессии генов, участвующих в регуляции метаболизма аминокислот, в опухолевых клетках А-549 по сравнению с фибробластами легкого Wi-38

Ген	log ₂ FoldChange	P _{adj}
<i>KYNU</i>	6,83	$1,43 \times 10^{-54}$
<i>GFPT2</i>	4,88	$6,81 \times 10^{-98}$
<i>NAT8L</i>	3,83	$7,43 \times 10^{-46}$
<i>SMOX</i>	3,36	$1,14 \times 10^{-80}$
<i>ALDH3A2</i>	2,79	$8,00 \times 10^{-63}$
<i>ALDH2</i>	2,28	$4,33 \times 10^{-30}$
<i>RIMKLB</i>	2,22	$7,15 \times 10^{-17}$
<i>ALDH3B1</i>	1,96	$6,47 \times 10^{-21}$
<i>GCLC</i>	1,91	$1,18 \times 10^{-16}$
<i>GCLM</i>	1,71	$1,10 \times 10^{-42}$
<i>SAT1</i>	1,54	$1,04 \times 10^{-28}$
<i>GCSH</i>	1,51	$9,90 \times 10^{-07}$
<i>HMGCS1</i>	1,49	$3,01 \times 10^{-15}$
<i>SETD7</i>	1,27	$1,47 \times 10^{-15}$
<i>PSPH</i>	1,21	$2,85 \times 10^{-11}$
<i>NIT2</i>	1,18	$1,68 \times 10^{-11}$
<i>PCCA</i>	1,17	$9,95 \times 10^{-05}$
<i>ALDH1B1</i>	1,08	$1,39 \times 10^{-21}$
<i>MRI1</i>	1,08	$1,72 \times 10^{-04}$
<i>GOT2</i>	1,05	$5,08 \times 10^{-30}$
<i>AADAT</i>	1,05	$1,85 \times 10^{-04}$
<i>CNDP2</i>	1,02	$1,29 \times 10^{-14}$
<i>GLUD1</i>	1,01	$4,58 \times 10^{-06}$
<i>PSAT1</i>	1,01	$4,98 \times 10^{-27}$
<i>AFMID</i>	1	$7,67 \times 10^{-05}$
<i>AACS</i>	-1	$1,79 \times 10^{-10}$
<i>SHMT1</i>	-1,18	$1,43 \times 10^{-03}$
<i>MTAP</i>	-1,26	$2,87 \times 10^{-07}$
<i>GPT2</i>	-1,34	$1,26 \times 10^{-10}$
<i>PLOD1</i>	-1,62	$6,20 \times 10^{-55}$
<i>SMYD3</i>	-1,81	$1,12 \times 10^{-26}$
<i>KYAT3</i>	-1,84	$4,01 \times 10^{-19}$
<i>BCKDHB</i>	-1,99	$1,96 \times 10^{-13}$
<i>BCAT1</i>	-2,04	$1,06 \times 10^{-25}$
<i>ALDH6A1</i>	-2,06	$7,49 \times 10^{-12}$

Продолжение таблицы Б.6

Ген	log ₂ FoldChange	P _{adj}
<i>IVD</i>	-2,1	4,32×10 ⁻²²
<i>P4HA1</i>	-2,76	1,32×10 ⁻¹⁰³
<i>AOX1</i>	-3,31	2,37×10 ⁻⁹⁰

Таблица Б.7 – Изменение экспрессии генов, участвующих в регуляции метаболизма пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, в опухолевых клетках А-549 по сравнению с фибробластами легкого Wi-38

Ген	log ₂ FoldChange	P _{adj}
Метаболизм пуриновых нуклеотидов		
<i>PDE4D</i>	3,05	5,96×10 ⁻⁵³
<i>APRT</i>	2,66	1,70×10 ⁻³⁶
<i>ADA</i>	2,21	3,93×10 ⁻⁰⁷
<i>ENTPD6</i>	2,02	8,78×10 ⁻⁵⁸
<i>PDE7B</i>	1,85	6,31×10 ⁻⁰⁸
<i>ENTPD1</i>	1,66	1,07×10 ⁻¹²
<i>HDDC3</i>	1,66	1,37×10 ⁻¹³
<i>PDE4B</i>	1,62	2,00×10 ⁻⁰⁸
<i>NT5C</i>	1,37	6,32×10 ⁻¹¹
<i>NTPCR</i>	1,26	8,39×10 ⁻¹⁴
<i>HDDC2</i>	1,23	2,07×10 ⁻¹³
<i>ITPA</i>	1,23	4,68×10 ⁻¹³
<i>NME4</i>	1,16	4,09×10 ⁻⁰⁸
<i>NT5C2</i>	1,14	1,26×10 ⁻⁰⁷
<i>NME1</i>	1,08	1,50×10 ⁻¹⁰
<i>AK3</i>	1,06	2,26×10 ⁻⁰⁹
<i>PFAS</i>	1,05	6,88×10 ⁻⁰⁷
<i>PDE8A</i>	1,03	1,62×10 ⁻⁰⁸
<i>PNP</i>	1,00	1,87×10 ⁻⁰⁶
<i>ADCY6</i>	-1,09	1,01×10 ⁻⁰⁴
<i>NUDT16</i>	-1,10	3,63×10 ⁻⁰⁵
<i>PGM1</i>	-1,11	3,67×10 ⁻²³
<i>AK1</i>	-1,13	1,47×10 ⁻⁰⁶
<i>PAPSS2</i>	-1,13	1,81×10 ⁻¹⁰
<i>ADCY1</i>	-1,18	2,32×10 ⁻¹¹
<i>PGM2</i>	-1,37	5,74×10 ⁻¹⁷
<i>XDH</i>	-1,40	7,35×10 ⁻⁰⁴
<i>DCK</i>	-1,69	7,04×10 ⁻¹⁸

Продолжение таблицы Б.7

Ген	log ₂ FoldChange	P _{adj}
<i>PDE6D</i>	-1,71	4,36×10 ⁻²⁰
<i>NT5E</i>	-2,60	2,47×10 ⁻¹⁵⁰
<i>AK4</i>	-2,68	1,09×10 ⁻⁸⁷
Метаболизм пиримидиновых нуклеотидов*		
<i>DTYMK</i>	1,36	1,05×10 ⁻⁰⁹
<i>TYMS</i>	1,36	2,98×10 ⁻²⁶
<i>DHODH</i>	1,32	6,00×10 ⁻⁰⁶
<i>DCTD</i>	1,04	1,29×10 ⁻¹²
<i>UPP1</i>	1,00	2,09×10 ⁻⁰⁹
<i>UCK1</i>	-1,01	7,58×10 ⁻⁰⁹
<i>CDA</i>	-1,59	3,17×10 ⁻⁰⁶

*Повторяющиеся строки удалены

Таблица Б.8 – Изменение экспрессии генов, участвующих в нейтрализации активных форм кислорода и азота, в опухолевых клетках А-549 по сравнению с фибробластами легкого Wi-38

Ген	log ₂ FoldChange	P _{adj}
<i>CP</i>	3,96	1,36×10 ⁻¹⁰
<i>G6PD</i>	3,90	9,83×10 ⁻¹⁰¹
<i>GGT1</i>	3,81	1,91×10 ⁻³⁵
<i>GPX3</i>	3,54	1,53×10 ⁻⁰⁹
<i>HMOX1</i>	3,53	1,82×10 ⁻⁵⁴
<i>GSR</i>	3,51	2,76×10 ⁻⁷⁴
<i>PGD</i>	3,22	2,11×10 ⁻²³⁴
<i>MGST1</i>	3,01	2,77×10 ⁻⁷⁵
<i>NQO1</i>	2,88	6,02×10 ⁻¹⁰⁶
<i>STEAP3</i>	2,31	9,67×10 ⁻⁵⁶
<i>TXNRD1</i>	2,14	5,12×10 ⁻⁶⁸
<i>GGT5</i>	2,14	0,002747
<i>SLC3A2</i>	2,13	6,13×10 ⁻⁵⁶
<i>GCLC</i>	1,91	1,46×10 ⁻¹⁵
<i>SLC7A11</i>	1,73	3,34×10 ⁻²⁸
<i>GCLM</i>	1,71	2,33×10 ⁻⁴³
<i>SAT1</i>	1,55	2,10×10 ⁻³⁰
<i>FTL</i>	1,47	2,79×10 ⁻¹⁸
<i>VDAC3</i>	1,40	1,22×10 ⁻²⁴
<i>FTH1</i>	1,31	2,29×10 ⁻²³
<i>SLC39A8</i>	1,25	0,011973

Продолжение таблицы Б.8

Ген	log ₂ FoldChange	P _{adj}
<i>GGCT</i>	1,18	6,23×10 ⁻¹⁰
<i>GSTO1</i>	1,18	1,53×10 ⁻¹⁷
<i>MGST3</i>	1,04	6,01×10 ⁻⁰⁹
<i>CHAC1</i>	-1,12	0,043458
<i>GSTM2</i>	-1,46	0,001966
<i>GPX8</i>	-1,52	1,08×10 ⁻²⁴
<i>ATG5</i>	-2,32	4,47×10 ⁻¹²
<i>ACSL5</i>	-4,33	2,56×10 ⁻¹²
<i>GSTM3</i>	-4,65	2,73×10 ⁻³⁹
<i>GSTM1</i>	-5,42	6,56×10 ⁻²²

Таблица Б.9 – Количество дифференциально экспрессирующихся генов в образцах клеток после обработки ХПС, удовлетворяющих условиям $|\log_2FC| > 0,5$, $p_{adj} \leq 0,05$

Условие	Количество генов
А-549 3ч 1мин	860
А-549 3ч 2мин	387
А-549 24ч 1мин	2073
Wi-38 3ч 1мин	443
Wi-38 3ч 2мин	306
Wi-38 24ч 1мин	923

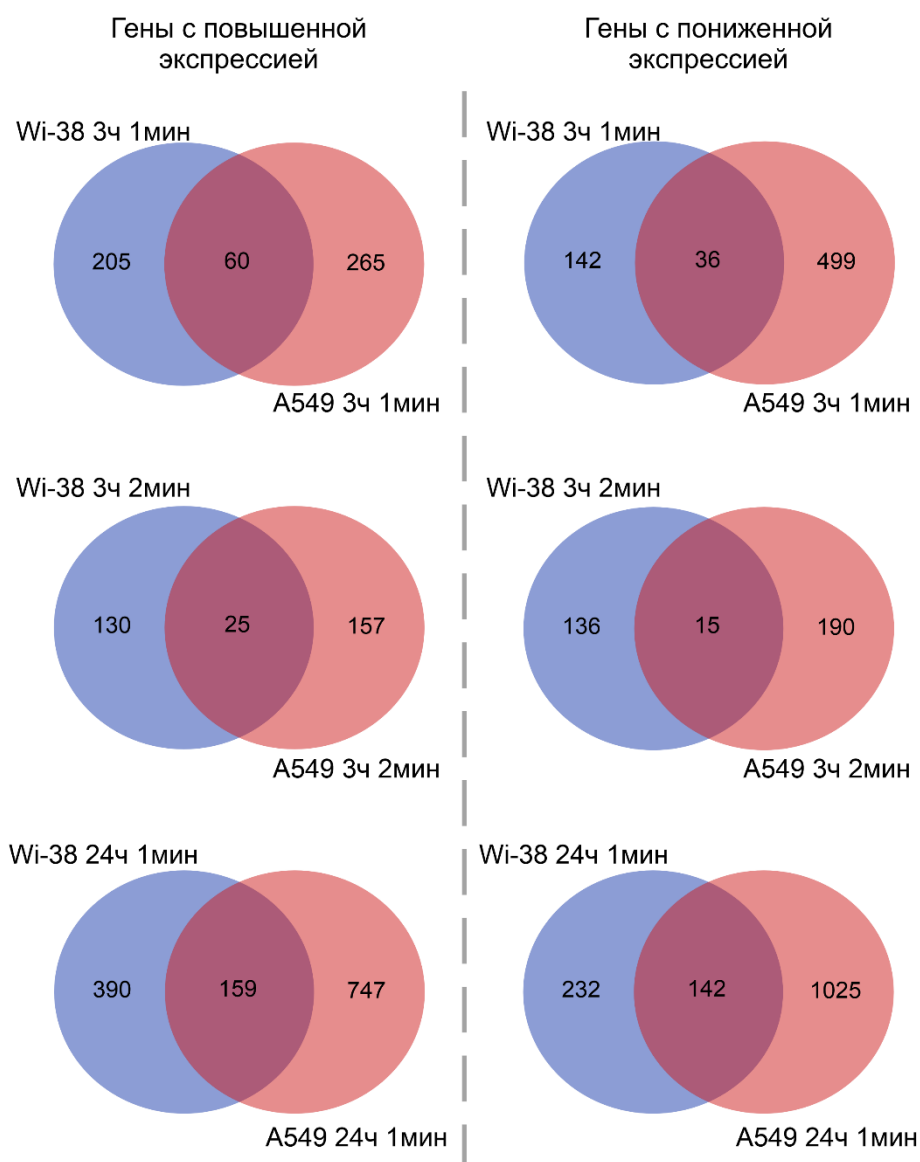


Рисунок Б.2 - Попарные сравнения наборов ДЭГ между здоровыми и опухолевыми клетками

Таблица Б.10 - Пороговые значения изменения экспрессии генов, использованных для функционального анализа дифференциально экспрессирующихся генов из образцов клеток A549 и Wi-38, обработанных ХПС в течение 1 мин, выраженные в виде $\log_2FC$.

Код образца	Пороговое значение $\log_2FC$
A_3ч/60с_up*	0,63
A_24ч/60с_up	1,35
A_3ч/60с_dn**	-0,79
A_24ч/60с_dn	-1,04
W_3ч/60с_up	0,57
W_24ч/60с_up	0,93
W_3ч/60с_dn	-0,51
W_24ч/60с_dn	-0,62

*обозначение «_up» соответствует генам с повышенной относительно контроля экспрессией

**обозначение «_dn» соответствует генам с пониженной относительно контроля экспрессией

Таблица Б.11 - Изменение экспрессии генов, экспрессия которых регулируется транскрипционным фактором Nrf2, через 3 ч после обработки в клетках A549

Символ гена	Название гена	$\log_2FC$	Скорректированное значение p.value
<i>GCLC</i>	Глутамат-цистеин лигаза, каталитическая субъединица	0,4	$6,3 \times 10^{-03}$
<i>GSR</i>	Глутатиондисульфид редуктаза	0,4	$1,6 \times 10^{-02}$
<i>NQO1</i>	NAD(P)H хинон дегидрогеназа 1	0,5	$1,3 \times 10^{-02}$
<i>PRDX1</i>	Пероксиредоксин 1	0,5	$1,5 \times 10^{-02}$
<i>SRXN1</i>	Сульфиредоксин 1	0,6	$1,1 \times 10^{-06}$

Продолжение таблицы Б.11

Символ гена	Название гена	log ₂ FC	Скорректированное значение p.value
<i>TXN</i>	Тиоредоксин	0,5	$3,5 \times 10^{-02}$
<i>CYP1B1</i>	Член подсемейства В семейства 1 цитохромов P450	0,5	$1,0 \times 10^{-03}$
<i>EPHX1</i>	Эпоксидгидролаза 1	0,9	$2,8 \times 10^{-09}$
<i>FTH1</i>	Тяжелая цепь ферритина 1	0,5	$3,1 \times 10^{-03}$
<i>HMOX1</i>	Гем оксигеназа 1	1,4	$4,1 \times 10^{-09}$
<i>BLVRA</i>	Биливердин редуктаза А	0,5	$4,4 \times 10^{-02}$
<i>ATF4</i>	Активирующий транскрипционный фактор 4	0,8	$5,0 \times 10^{-07}$
<i>SQSTM1</i>	Секвестосома 1 (p62)	0,5	$1,2 \times 10^{-06}$