АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности «6D070100 – Биотехнология»

Жунусовой Айгуль Сагиндыковны

Механизмы изменения энергетического метаболизма раковых клеток простаты при действии низкотемпературной плазмы

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена изучению клеточных механизмов изменения энергетического метаболизма нормальных и раковых клеток простаты при действии низкотемпературной плазмы.

Актуальность темы исследования. Рак простаты занимает второе место в мире по смертности от злокачественных новообразований среди мужчин после рака легких и бронхов (*Siegel R.L., et al.*, 2018), а в Казахстане - третье место после рака легких и желудка (*Кайдарова Д.Р. и др.*, 2017). Это медленно развивающаяся болезнь, которая, как и многие другие виды рака, обычно неизлечима при переходе в метастатическую форму (*Howlader N.*, et al., 2015). Существующие на данный момент режимы химиотерапии имеют серьезные побочные эффекты и не обеспечивают лечение на поздних стадиях заболевания. Настоятельная необходимость в новых медицинских подходах к лечению онкологических больных диктуется и острой проблемой развития резистентности опухолевых клеток к химио- и лучевой терапии (*Zhang W., et al.*, 2015). Низкотемпературная плазма атмосферного давления была недавно идентифицирована как мощная технология для модуляции функции как прокариотических, так и эукариотических клеток. Чтобы реализовать весь потенциал низкотемпературной плазменной обработки для терапии рака, необходимо понять точные механизмы, посредством которых плазма вызывает клеточную смерть (гибель клеток). А также не менее важным вопросом является изучение рисков побочных эффектов при воздействии низкотемпературной плазмы на здоровые клетки. Основной целью этой работы является изучение влияния косвенной (не прямой) низкотемпературной плазмы, генерируемой микросекундным (импульсным) диэлектрическим барьерным разрядом, на митохондрио-опосредованные процессы. Митохондрии организуют клеточный метаболизм и сигнализацию, и поэтому они являются многообещающей мишенью для терапии рака (*Panngom K., et al.*, 2013). Тем не менее, было продемонстрировано, что высокие дозы плазмы индуцируют апоптоз в других раковых образованиях из-за массивной генерации внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) (*Kalghatgi S., et al.*, 2011; *Fridman A.*, 2008), а митохондрии являются одним из основных внутриклеточных источников АФК (*Starkov A.A.*, 2008). Эти факты свидетельствуют, что выяснение механизмов воздействия низкотемпературной плазмы на митохондрии имеет решающее значение для изучения того, как мы

можем продвигать демонстрации доказательной концепции в клинически значимый метод для лечения рака.

Новый противоопухолевой препарат или терапевтическое лечение, нацеленное только на раковые клетки и не влияющее на нормальные, является одним из наиболее актуальных вопросов в исследовании рака. Достижение такого вида селективности очень сложно, поэтому побочные эффекты химиотерапии и лучевой терапии остаются серьезной проблемой. В данной работе было проведено сравнение результатов низкотемпературной плазменной обработки для различающихся по метаболизму нормальных и раковых клеток простаты.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение механизмов действия низкотемпературной плазмы на энергетический метаболизм раковых и нормальных клеток простаты.

Для достижения цели были поставлены следующие основные **задачи**:

1. Определить цитотоксическое действие низкотемпературной плазмы на раковые и нормальные клетки простаты.
2. Выявить клеточный механизм развития процесса апоптоза раковых и нормальных клеток простаты при воздействии низкотемпературной плазмы.
3. Определить степень влияния низкотемпературной плазмы на мембранный потенциал митохондрий и дыхательную функцию раковых и нормальных клеток простаты.
4. Провести анализ окислительного стресса, вызванного низкотемпературной плазмой в раковых и нормальных клетках простаты.
5. Установить степень влияния низкотемпературной плазмы на уровень кальция в цитозоле раковых и нормальных клеток простаты.
6. Изучить энергетический метаболизм раковых клеток простаты в условиях кислой pH, а также роль переносчиков дикарбоновой кислоты в транспорте сукцината через клеточную мембрану.

Объект исследования. Объектами исследования были человеческие метастатические раковые клетки простаты DU145, а также первичные нормальные клетки простаты PrEC.

Методы исследования. Культивирование клеток *in vitro*, проточная цитометрия (*BD Accurri C6*), конфокальная микроскопия (*Olympus FluoView*), респирометрия с высоким разрешением (*Oroboros Oxygraph-2k*), флуоресцентная спектроскопия (*BioTek Synergy 4*), микроскопия (*Leica MZ16F, Motic AE2000*), спектрофотометрия (*NanoDrop*), метод генерации плазмы (*Quinta*), Вестерн-блот, ПЦР и метод статистического анализа (*GraphPad Prism*).

Научная новизна исследования:

- Впервые обнаружено, что фосфатно-солевой буфер (PBS), обработанный низкотемпературной плазмой (частота 250 Гц, мощность 2,2 Вт и время обработки 30 сек), оказывает сильное цитотоксическое действие на раковые клетки простаты.
- Установлено, что процесс апоптоза, вызванный действием низкотемпературной плазмы, наступает в результате активации каспаз, который

приводит к гибели раковых клеток простаты через внутренние (связанные с митохондриями) и внешние (поддерживаемые рецепторами смерти) апоптотические пути.

- Впервые доказано индуцированный низкотемпературной плазмой изменение митохондриального энергетического метаболизма раковых клеток простаты. Показано влияние выбранных доз плазмы на мембранный потенциал митохондрий, процесс окислительного фосфорилирования клеток и окислительный стресс.

- Впервые были установлены особенности изменения энергетического метаболизма раковых клеток простаты в условиях кислой среды, где особое внимание было уделено окислению сукцината и роли переносчиков при поглощении сукцината.

- Впервые оценен профиль экспрессии транспортеров дикарбоновой кислоты (NaDC1, NaDC3 и NaCT) в нормальных и раковых клетках простаты.

Теоретическая значимость работы. Результаты диссертационной работы, в частности, клеточные механизмы воздействия низкотемпературной плазмы и кислой среды вносят существенный вклад в понимание фундаментальных проблем рака простаты. Исследование метаболических параметров митохондрий раковых и нормальных клеток простаты позволит идентифицировать биоэнергетические характеристики, которые могут рассматриваться как анти-раковые мишени. Полученные материалы способствовали определению опосредованных низкотемпературной плазмой митохондрий-зависимых про-апоптотических каскадов в раковых клетках.

Практическая ценность работы. К настоящему времени есть очень ограниченное число работ, посвященных биоэнергетическим процессам рака простаты, хотя известно, что практически все клеточные процессы энергозависимые, как и то, что механизмы смерти и выживания в огромной степени определяются активностью митохондрий. Во-первых, полученные материалы помогут прояснить механизмы, которые обуславливают устойчивость к процессу апоптоза раковых клеток простаты. Во-вторых, установление положительного действия низкотемпературной плазмы на энергетическую систему клетки имеет потенциал для разработки эффективного лечения рака комплементарного хирургическому вмешательству и химиотерапии.

Данные, представленные в данной работе, показывают, что экспрессия NaDC3 клетками простаты коррелирует со злокачественной трансформацией, а не является универсальным механизмом, полученным изменениями pH клеточного микроокружения. В раковых клетках простаты продемонстрирован приток сукцината через NaDC3. Это потенциально может быть использовано для молекулярной диагностики, основанной на графической визуализации негликолитических опухолей в кислой микросреде, подобно утилизации глюкозы на основе позитронно-эмиссионной томографии. Использование меченого сукцината позволит разработать технологию обнаружения потоков сукцината для прогнозирования стадии заболевания и реакции на химиотерапию. Кроме того, опосредованное транспортером дикарбоксилата

поглощение сукцината может дать новый прогностический биомаркер и мишень для противораковой терапии, не оказывающей влияние на нормальные клетки простаты.

Практическая ценность исследования заключается в разработке новой технологии воздействия на раковые клетки простаты DU145 с использованием низкотемпературной плазмы (Акт внедрения №28-2018 от 16 ноября 2018 г.)

Кроме того, результаты работы могут быть включены в курс лекций по клеточной биологии, онкологии, физиологии, патофизиологии, биоэнергетике, биомедицине, биофизике и биохимии для студентов, магистрантов и докторантов высших учебных заведений биомедицинского профиля. В частности, они включены в программы курсов «Физиолого-биофизические механизмы действия биоактивных веществ на организм» (Акт о внедрении завершенной научно-исследовательской работы в учебный процесс, протокол №3 от 24 октября 2018 г.) для студентов по специальности Биология и Биотехнология Казахского национального университета имени аль-Фараби.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Низкотемпературная плазма обладает цитотоксическим эффектом для двух различных типов клеток простаты человека (раковые DU145 и нормальные PrEC клетки) в зависимости от интенсивности (дозы) и продолжительности воздействия.
2. Низкотемпературная плазменная обработка индуцирует процесс апоптоза, как в раковых DU145, так и в нормальных PrEC клетках.
3. Низкотемпературная плазма оказывает негативное влияние на дыхательные способности DU145 раковых и PrEC нормальных клеток простаты. Однако нормальные клетки продемонстрировали тенденцию восстанавливать активность окислительного фосфорилирования в течение 24 часов по сравнению с раковыми клетками, у которых была снижена биоэнергетическая активность.
4. Активные формы кислорода, индуцированные низкотемпературной плазмой, имеют немитохондриальное происхождение.
5. После обработки низкотемпературной плазмой уровень ионов Ca^{2+} в цитозоле изменяется в зависимости от типа клеток.
6. В DU145 раковых клетках при кислой pH происходит активное окисление сукцината. Транспорт сукцината происходит через NaDC3 транспортера.

Основные результаты исследований и выводы:

1. Установлено, что PBS, обработанный низкотемпературной плазмой, обладает цитотоксическим действием на раковые клетки простаты. Уровень цитотоксичности раствора PBS, обработанного плазмой, был на 20% ниже в нормальных PrEC клетках, чем в раковых клетках DU145, и зависел от интенсивности (дозы) плазмы, продолжительности воздействия и типа клеток.
2. Доказано, что обработка низкотемпературной плазмой вызывает процесс апоптоза в метаболически активных DU145 раковых и метаболитически пассивных PrEC нормальных клетках. При этом, процесс апоптоза в раковых клетках осуществляется внутренними (через митохондрии)

и внешними путями (через участия рецепторами смерти), тогда как в нормальных клетках данный процесс происходит только через участия рецепторами смерти.

3. Показано, что воздействие с помощью раствора PBS, обработанного низкотемпературной плазмой на раковые и нормальные клетки вызывает снижение мембранного потенциала митохондрий до 30%. После плазменной обработки через 24 часа нормальные PrEC клетки были способны восстанавливать мембранный потенциал митохондрий до 70%, в то время как раковые DU145 клетки лишь до 40%.

4. Установлено, что PBS, обработанный низкотемпературной плазмой, отрицательно влияет на дыхательные функции DU145 раковых и PrEC нормальных клеток. Однако через 24 часа нормальные клетки по сравнению с раковыми клетками со сниженной биоэнергетической активностью способны восстанавливать активность окислительного фосфорилирования.

5. Выявлено, что низкотемпературная плазма приводит к окислительному стрессу DU145 раковых и PrEC нормальных клеток простаты. При этом установлено, что под действием низкотемпературной плазмы происходит появление активных форм кислорода вне митохондрии.

6. Показано, что в результате низкотемпературной плазменной обработки раковых DU145 клеток уровень Ca^{2+} в данных клетках не изменялся. Колебания ионов кальция возникали при добавлении АТФ к раковым клеткам DU145, не обработанным низкотемпературной плазмой. Наблюдалось резкое повышение уровня цитозольного кальция при добавлении АТФ к нормальным PrEC клеткам, инкубированным в растворе PBS, обработанного низкотемпературной плазмой, а в раковых клетках DU145 наблюдался стабильный рост.

7. Выявлено окисление сукцината в DU145 раковых клетках простаты в условиях кислого микроокружения. Показано, что процесс окисления осуществляется в условиях pH 6,8 среды. Кроме того установлено, что транспорт сукцината происходит через NaDC3 транспортера.

Личный вклад автора. Автор самостоятельно провел анализ литературных данных по теме исследований, экспериментальную работу, статическую обработку и анализ результатов исследования, написание и оформление рукописи диссертации.

Связь с планом основных научных работ. Работа поддерживалась Фондами «*Cornelius Beukenkamp*» (2013-2015 г.г.) и «*Mary DeWitt Pettit Fellowship*» (2013-2015 г.г.) для изучения рака простаты (руководитель проекта профессор университета Дрексель З.С. Орынбаева), проводилась на базе лаборатории патофизиологии митохондрии кафедры хирургии Университета Дрекселя. Кроме того, часть работы была проведена на кафедре биофизики и биомедицины по теме «Актуальные проблемы современной биофизики и биомедицины» (2013-2018 г.г.).

Основные результаты диссертационной работы были доложены:

- на Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Фараби әлемі» (2013, 2014, 2017, 2019, Алматы, Казахстан);

- на Международной научной конференции «Research Day 2014» (2014, Philadelphia, USA);

- на Международной научной конференции «Gordon Research Conferences, Bioelectrochemistry» (2014, Biddeford, USA);

- на Международной научной конференции «The 1st International Workshop on Plasma for Cancer Treatment» (2014, Washington, D.C., USA);

- на Международном симпозиуме «International Symposium on molecular medicine and infectious disease. Cancer biology and neoplastic disease» (2014, Philadelphia, USA);

- на Международном фарабиевском чтении (2015, 2017, Алматы, Казахстан);

- на Международной научной конференции «Fourth AACR International Conference on Frontiers in Basic Cancer Research» (2015, Philadelphia, USA).

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 19 печатных работах, в том числе 2 статьи и 1 тезис в международных журналах с импакт-фактором, цитируемые в базах данных *Thomson Reuters* и *Scopus*; 4 статьи в республиканских научных изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК; 1 статья в республиканском журнале; 4 тезиса в сборниках международных конференций и симпозиумов за рубежом; 7 тезисов в материалах международных конференций Республики Казахстан.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 131 странице компьютерного текста и состоит из нормативных ссылок, обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения и списка использованных источников из 320 наименований. Работа содержит 36 рисунков, 4 таблицы и 2 приложения.