
УСИЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА АЦЕТАТА НА КЛЕТКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И Т-ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА ПРИ ПОМОЩИ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ

Сериев Исмаил Рамазанович,

Инженер, аспирант

Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, г. Москва
sirnnr@gmail.com

Фомичева Мария Сергеевна,

Лаборант, студент

Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, г. Москва
Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.
Пирогова, г. Москва
masha.fomser@gmail.com

Алексеева Юлия Дмитриевна,

Лаборант, студент

Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, г. Москва
Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.
Пирогова, г. Москва
julaleks04@gmail.com

Петренко Кристина Сергеевна,

Лаборант, студент

Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, г. Москва
Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.
Пирогова, г. Москва
kristina.petrenko2004@gmail.com

Андреещев Александр Сергеевич,

Лаборант, студент

Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, г. Москва
Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.
Пирогова, г. Москва
andr.eger.2004@mail.ru

Аннотация

Раствор Хенкса, обработанный холодной плазмой, содержит активные формы кислорода и азота. Получено двукратное усиление цитотоксического действия медроксипрогестерона ацетата на клетки рака молочной железы и Т-лимфобластного лейкоза при его комбинировании с раствором Хенкса, обработанным холодной плазмой. Раствор, обработанный плазмой, инициирует у клеток рака молочной железы

транскрипцию фактора LC3II, участвующего в аутофагии. Применение комбинации медроксипрогестерона ацетата с обработанным холодной плазмой раствором Хенкса инициирует у клеток рака молочной железы транскрипцию фактора p53, участвующего в апоптозе. Полученные результаты говорят о возможных перспективах использования раствора Хенкса, обработанного плазмой при помощи источника САРКО при лечении рака молочной железы и Т-лимфобластного лейкоза.

Ключевые слова: холодная плазма, медроксипрогестерона ацетат, противоопухолевая терапия, рак молочной железы, Т-лимфобластный лейкоз, цитотоксический эффект, синергизм, апоптоз, аутофагия, активные формы кислорода (АФК)

ENHANCEMENT OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF MEDROXYPROGESTERONE ACETATE ON BREAST CANCER AND T- LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELLS USING COLD PLASMA

Seriev Ismail Ramazanovich,

Engineer, Postgraduate Student

A.M. Prokhorov Institute of General Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow

sirnnr@gmail.com

Fomicheva Maria Sergeevna,

Research Assistant, Student

A.M. Prokhorov Institute of General Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

masha.fomser@gmail.com

Alexeeva Yulia Dmitrievna,

Research Assistant, Student

A.M. Prokhorov Institute of General Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

julaleks04@gmail.com

Petrenko Kristina Sergeevna,

Research Assistant, Student

A.M. Prokhorov Institute of General Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

kristina.petrenko2004@gmail.com

Andreeshchev Alexander Sergeevich,

Research Assistant, Student

A.M. Prokhorov Institute of General Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

andr.eger.2004@mail.ru

ABSTRACT

Cold plasma-treated Hank's solution contains reactive oxygen and nitrogen species. A two-fold enhancement of the cytotoxic effect of medroxyprogesterone acetate on breast cancer and T-lymphoblastic leukemia cells was achieved when combined with cold plasma-treated Hank's solution. The plasma-treated solution induced transcription of the LC3II factor, involved in autophagy, in breast cancer cells. The application of the combination of medroxyprogesterone acetate with cold plasma-treated Hank's solution induced transcription of the p53 factor, involved in apoptosis, in breast cancer cells. The obtained results indicate potential prospects for using Hank's solution treated with plasma using the CAPKO source in the treatment of breast cancer and T-lymphoblastic leukemia.

Keywords: cold plasma, medroxyprogesterone acetate, anticancer therapy, breast cancer, T-lymphoblastic leukemia, cytotoxic effect, synergism, apoptosis, autophagy, reactive oxygen species (ROS).

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) и Т-лимфобластный лейкоз являются распространённым онкологическим заболеванием с высокой летальностью [1, 2]. Стероидные гормональные препараты, такие, как медроксипрогестерона ацетат используют для лечения РМЖ [3]. Однако опухолевые клетки часто приобретают резистентность к этому препарату, поэтому его цитотоксическое действие можно усиливать при помощи различных комбинаций.

Новым физическим методом лечения онкологических заболеваний может стать обработка опухоли холодной плазмой или растворами, в которых под действием плазмы образовались активные формы кислорода [4, 5]. Уже получены положительные результаты по усилению действия цитостатических препаратов при помощи PTS [6, 7]. В данной работе мы проанализировали возможность усиления цитотоксического действия медроксипрогестерона ацетата на клетки РМЖ и Т-лимфобластного лейкоза при помощи раствора Хенкса, обработанного холодной плазмой.

Материалы и методы

Использованные материалы включают: раствор Хенкса (ООО НПП «ПанЭко», кат. № P020п), питательную среду DMEM (ООО НПП «ПанЭко», кат. № C420p), питательную среду RPMI (ООО НПП «ПанЭко», кат. № C350), фетальную бычью сыворотку (ООО НПП «ПанЭко», кат. № FB-1001), пенициллин-стрептомицин (ООО НПП «ПанЭко», кат. № A073p'), глутамин (ООО НПП «ПанЭко», кат. № Ф032), трипановый синий краситель (ООО НПП «ПанЭко», кат. № 0130), МТТ (тиазолил синий/тетразолия бромид, кат. № CAS-298-93-1(Диа-М)), набор реагентов для выделения РНК (Синтол, кат. № EX-515-100), набор реагентов для обратной транскрипции (Синтол, кат. № OT-1), набор реагентов для ПЦР (Синтол, кат № R-402).

Обработка раствора Хенкса холодной плазмой

Обработка раствора Хенкса холодной плазмой производилась в течение 5 мин с помощью источника «САРКО» [8-10]. Частота $21 \pm 0,3$ кГц, конечное напряжение 5 кВ. Обработываемый раствор находился в лунках 6-луночного планшета с диаметром 6 см в объёме 5 мл. Пьезотрансформатор подводился к поверхности раствора, так, что расстояние между ними составляло 5 мм, после чего между пьезотрансформатором и поверхностью раствора генерировался пьезоразряд. В полученном растворе были зарегистрированы H_2O_2 ($0,383 \pm 0,02$ mM), NO_2^- (106 ± 8 μ M) [11, 12].

Культивирование клеток

Клетки рака молочной железы MCF-7 культивировали в питательной среде DMEM с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки, глутамина (290 мг/л), пенициллина/стрептомицина и 20 % раствора Хенкса, обработанного холодной плазмой при помощи источника САРКО. Клетки Т-лимфобластного лейкоза аналогично культивировали в питательной среде RPMI. Оба вида клеток культивировали при температуре 37 °С и концентрации CO₂, равной 5 %. Цитотоксический эффект оценивался через 2 суток.

Анализ цитотоксического действия

С помощью окраски клеток трипановым синим красителем [13] определяли процент живых и мёртвых клеток, то есть жизнеспособность. С помощью метода МТТ, основанного на восстановлении тетразолиевого красителя НАДФ-зависимыми и гликолитическими ферментами, определяли дыхательную активность клеток [14].

Методам ПЦР в реальном времени определяли механизмы действия раствора, обработанного плазмой, и медроксипрогестерона ацетата по отдельности и в комплексе. Использованные праймеры указаны в таблице 1 [15, 16].

Таблица 1. Праймеры, использованные для PCR-RT.

Белок, кодируемый мРНК	Последовательность нуклеотидов в РНК
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGT R: GAAGATGGTGATGGGATTTCC
JAK2	F: GGGTGTTCGCGTCGCCACTT R: CAGATCGGGCGACCAGAGCGC
LCI3	F: GTACGAGAGCGAGAAGGACG R: AGACGGAAGATTGCACTCCG
P53	F: GCCGTGGCCATGTACAAG R: CTGAGCAGCGCTCATGG

Результаты и обсуждение

Раствор, обработанный холодной плазмой (PTS) снижал жизнеспособность клеток РМЖ на 20-25 % при времени обработки раствора до 2 мин и на 50-60 % при времени обработки раствора 5-20 мин (рис. 1). Медроксипрогестерона ацетат (МПА) снижал жизнеспособность клеток на 35 %, а в комплексе с раствором, обработанным плазмой, – на 50-60 % при времени обработки 0,5-10 мин и на 73-76 % при времени обработки 15-20 мин.

Цитотоксическое действие PTS на клетки Jurkat линейно зависело от времени обработки, и максимальное падение жизнеспособности на 52±4 % было достигнуто при 20 мин обработки. PTS увеличивал цитотоксическое действие МПА на клетки Jurkat, в результате чего их жизнеспособность падала с 65 до 35-27 %.

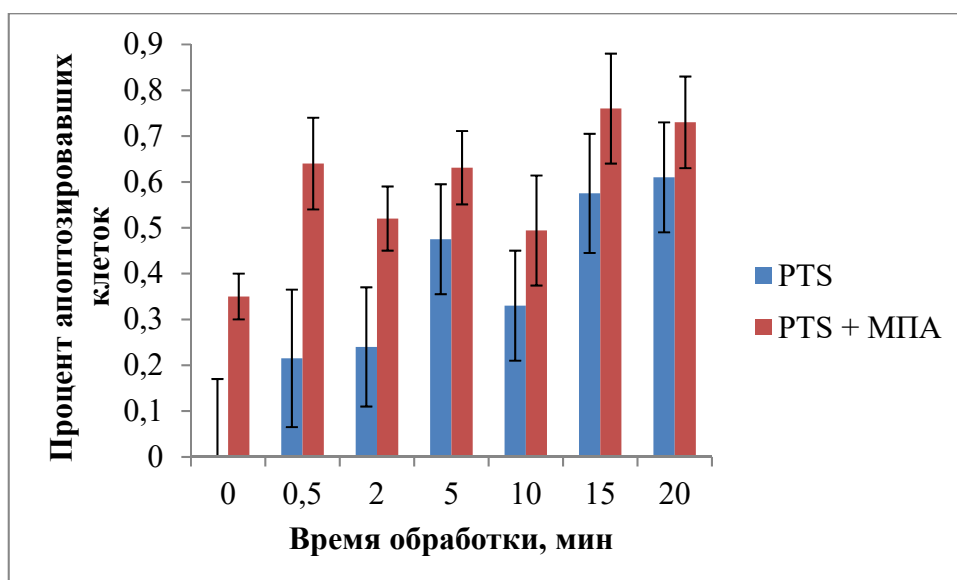


Рис. 1. Процент апоптозировавших клеток рака молочной железы MCF-7 после добавления в питательную среду раствора, обработанного холодной плазмой в течение разного времени (PTS).

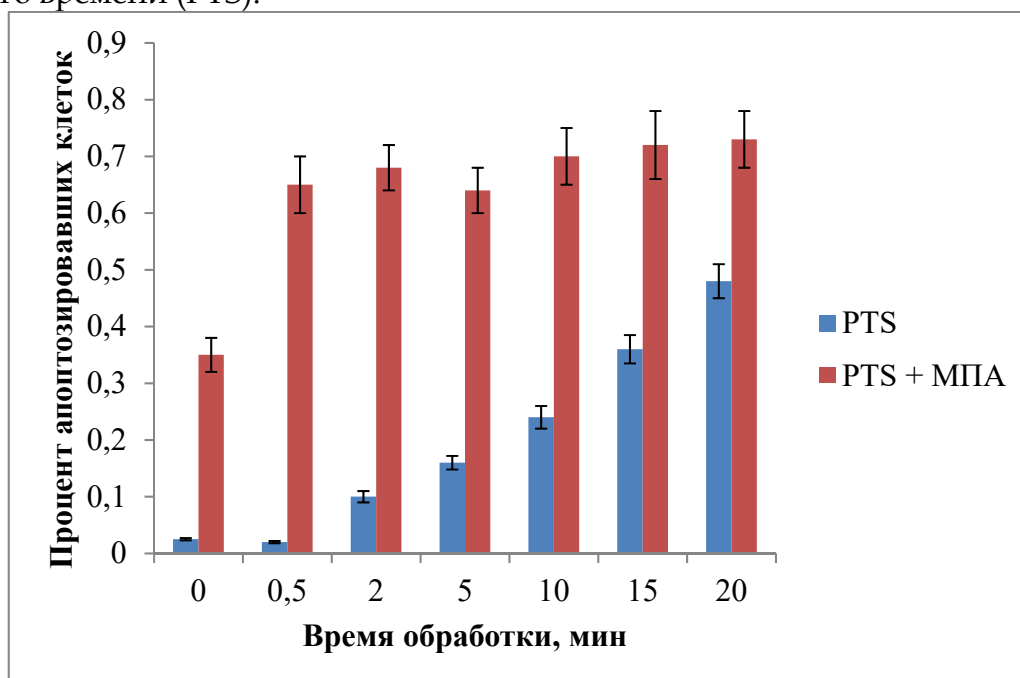


Рис. 2. Процент апоптозировавших клеток Т-лимфобластного лейкоза Jurkat после добавления в питательную среду раствора, обработанного холодной плазмой в течение разного времени (PTS).

Для анализа механизмов действия МПА и PTS на клетки рака молочной железы у них было изучено изменение транскрипции гена p53, участвующего в апоптозе [17], гена LC3II, участвующего в аутофагии [18], и JAK2, участвующего в пролиферации [19]. После воздействия раствором, обработанным плазмой в течение 5 мин, зафиксирована транскрипция фактора LC3II, отвечающего за аутофагию (рис. 3). Комплексное воздействие раствора, обработанного плазмой, и медроксипрогестерона ацетата уменьшало транскрипцию фактора митоза JAK2 и стимулировало транскрипцию фактора аутофагии LC3II и фактора апоптоза p53.

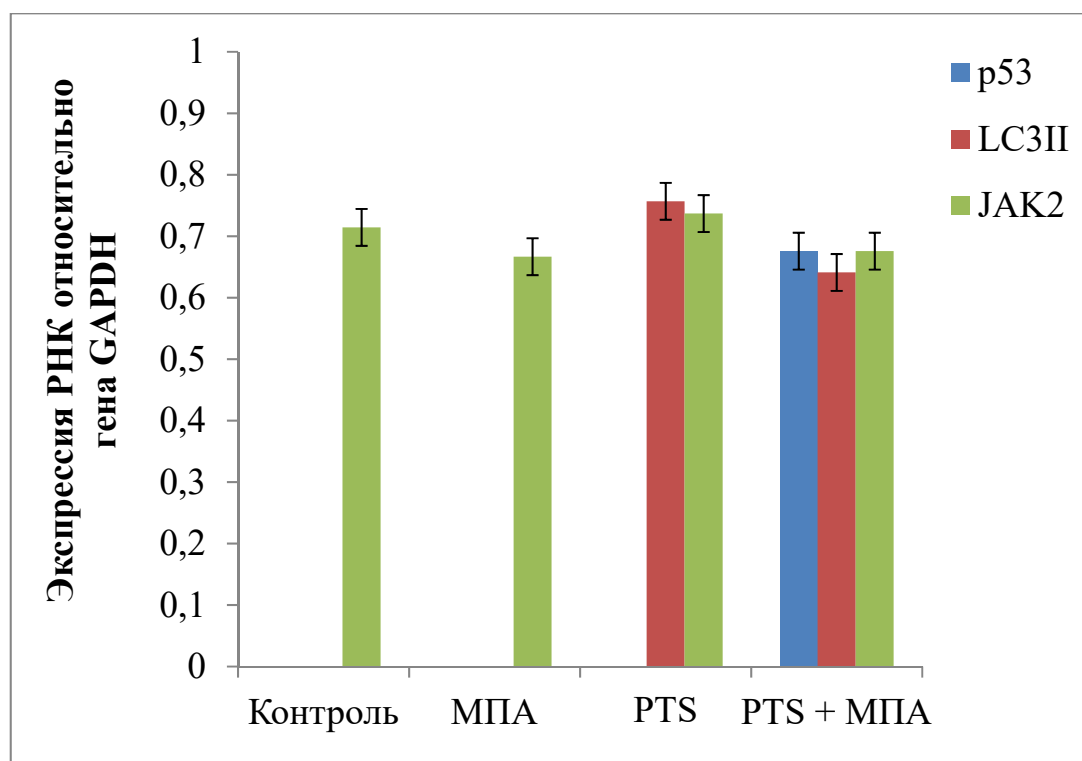


Рис. 3. Транскрипция генов p53, LC3II и JAK2 клетками MCF-7 после инкубации с МПА и PTS.

Можно сделать вывод о том, что сам PTS инициирует запуск аутофагии в клетках РМЖ. МПА действует на клетку через специфические сигнальные пути, но, видимо его влияния недостаточно для того, чтобы запустить запрограммированные пути клеточной гибели. Однако при одновременном действии PTS и МПА, действующих на разные мишени, наблюдается активация путей и аутофагии, и апоптоза, что сопровождается двукратным усилением цитотоксического эффекта.

Таким образом, раствор Хенкса, обработанный плазмой при помощи источника САРКО, оказывает цитотоксическое действие на клетки рака молочной железы и Т-лимфобластного лейкоза. Комплексное применение раствора, обработанного плазмой, и медроксипрогестерона ацетата оказывает синергетический цитотоксический эффект. Полученные результаты говорят о возможных перспективах использования источника САРКО при лечении рака молочной железы и Т-лимфобластного лейкоза.

Список литературы:

1. P.R. Colunga-Pedraza, J.E. Colunga-Pedraza, S.P. Peña-Lozano, A. Gómez-De León, G.J. Ruiz-Delgado, R.C. Ribeiro, Diagnosis and treatment of acute lymphoblastic leukemia in Latin America, *Hematology* 27 (2022) 971-976.
2. D.-D. Tang, Z.-J. Ye, W.-W. Liu, J. Wu, J.-Y. Tan, Y. Zhang, Q. Xu, Y.-B. Xiang, Survival feature and trend of female breast cancer: A comprehensive review of survival analysis from cancer registration data, *Breast* 79 (2025) 103862.
3. T.A. Fedotcheva, N.I. Fedotcheva, N.L. Shimanovsky, Progestins as anticancer drugs and chemosensitizers, new targets and applications, *Pharmaceutics*. 13 (2021) 1616.
4. H. Tanaka, S. Bekeschus, D. Yan, M. Hori, M. Keidar, M. Laroussi, Plasma-Treated Solutions (PTS) in Cancer Therapy, *Cancers (Basel)*. Vol. 13 (2021) P. 1737.
5. A.G. Akopdzhanov, N.L. Shimanovskii, D.S. Stepanova, T.A. Fedotcheva, A.V. Pulish, N.G. Gusein-zade, L.V. Kolik, K.E. M., The Cytotoxicity of Cold Atmospheric Plasma against

- HeLa Cancer Cells and its Modification with Pharmaceutical Substances, *Biophysics* 64 (2019) 1134-1137.
6. Y. Li, T. Tang, H.J. Lee, S. K., Selective Anti-Cancer Effects of Plasma-Activated Medium and Its High Efficacy with Cisplatin on Hepatocellular Carcinoma with Cancer Stem Cell Characteristics, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 3956.
 7. Y.J. Lee, S.W. Kim, M.H. Jung, Y.S. Kim, K.S. Kim, D.S. Suh, K.H. Kim, E.H. Choi, J. Kim, K.B. S., Plasma-activated medium inhibits cancer stem cell-like properties and exhibits a synergistic effect in combination with cisplatin in ovarian cancer *Free Radic. Biol. Med.* 182 (2022) 276-288.
 8. K.V. Artem'ev, D.V. Malakhov, L.V. Kolik, A.M. Davydov, N.G. Gusein-zade, Electrical Parameters of a Piezoelectric Transformer-Generated Nanosecond Spark Discharge in Air, *Bulletin of the Lebedev Physics Institute* 51 (2024) 262-267.
 9. K.V. Artemyev, N.N. Bogachev, N.G. Gusein-zade, T.V. Dolmatov, L.V. Kolik, E.M. Konchekov, S.E. Andreev, Study of Characteristics of the Cold Atmospheric Plasma Source Based on a Piezo Transformer, *Russian Physics Journal* Vol. 62 (2020) P. 105-111.
 10. M.E. Astashov, E.M. Konchekov, L.V. Kolik, S.V. Gudkov, Electric Impedance Spectroscopy in Trees Condition Analysis: Theory and Experiment, *Sensors* 22 (2022) 8310.
 11. T. Pavlik, V. Gudkova, D. Razvolyaeva, M. Pavlova, N. Kostukova, L. Miloykovich, L. Kolik, E. Konchekov, N. Shimanovskii, The Role of Autophagy and Apoptosis in the Combined Action of Plasma-Treated Saline, Doxorubicin, and Medroxyprogesterone Acetate on K562 Myeloid Leukaemia Cells, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 5100.
 12. T.I. Pavlik, T.A. Fedotcheva, N.G. Gusein-zade, S.N. L., Combined effects of doxorubicin, medroxyprogesterone acetate and cold-plasma-treated Hank's solution n the production of transforming growth factor b in human mononuclear leukocytes, *Pharmaceutical Chemistry Journal* 56 (2022) 583-586.
 13. M.J. Stoddart, Cell viability assays: introduction, *Methods Mol Biol.* Vol. 740 (2011) P. 1-6.
 14. J.C. Stockert, R.W. Horobin, L.L. Colombo, B.-C. A., Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives, *Acta Histochem.* 120 (2018) 159-167.
 15. Y. Xu, B. Guo, X. Liu, K. Tao, miR-34a inhibits melanoma growth by targeting ZEB1, *AGING* 13 (2021) 15538-15547.
 16. M. Zhuang, X. Ding, W. Song, H. Chen, H. Guan, Y. Yu, Z. Zhang, X. Dong, Correlation of IL-6 and JAK2/STAT3 signaling pathway with prognosis of nasopharyngeal carcinoma patients, *AGING* 13 (2021) 16667-16683.
 17. C. Marvalim, A. Datta, S.C. Lee, Role of p53 in breast cancer progression: An insight into p53 targeted therapy, *Theranostics* 13 (2023) 1421-1442.
 18. D.J. Klionsky, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition), *Autophagy* 17 (2021) 1-382.
 19. J.A. López-Mejía, J.C. Mantilla-Ollarves, L. Rocha-Zavaleta, Modulation of JAK-STAT Signaling by LNK: A Forgotten Oncogenic Pathway in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 14777.