әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті

ӘОЖ 616-006.6:577.121:576.32./36 Қолжазба құқығында

**ЖУНУСОВА АЙГУЛЬ САГИНДЫКОВНА**

# Қуық асты без ісік клеткаларының төмен температуралық плазма әсерінен энергетикалық метаболизмінің өзгеру механизмдері

6D070100 – Биотехнология

Философия докторы (PhD)
дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация

Ғылыми кеңесшілері:
биология ғылымдарының докторы,
профессор Төлеуханов С.Т.,
PhD, профессор Орынбаева З.С.
(Дрексель университеті, АҚШ)

Қазақстан Республикасы
Алматы, 2019

**МАЗМҰНЫ**


| | | |
|---|---|---|
| **НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР** | | 5 |
| **БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР** | | 6 |
| **КІРІСПЕ** | | 8 |
| **1** | **ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ** | 15 |
| 1.1 | Плазма жайлы түсінік | 15 |
| 1.1.1 | Плазманың түрлері және олардың медицинада қолданылуы | 15 |
| 1.1.2 | Төмен температуралық плазманың химиясы және оның құрамындағы бөлшектердің клеткаларға ықпалы | 17 |
| 1.1.3 | Төмен температуралық плазманың сүтқоректілер клеткаларына әсері | 21 |
| 1.2 | Митохондриялық биоэнергетика | 24 |
| 1.2.1 | Митохондрияларда жүретін энергетикалық процестер | 25 |
| 1.2.2 | Тыныс алу тізбегі мен тотыға фосфорлану | 27 |
| 1.2.3 | Митохондрияларда оттегінің және азоттың белсенді түрлерінің түзілуі | 38 |
| 1.3 | Қуық асты безі ісігі | 39 |
| 1.3.1 | Қалыпты қуық асты безі метаболизмі | 39 |
| 1.3.2 | Қуық асты безі ісігінің негізгі метаболиттік өзгерістері | 40 |
| 1.3.3 | Қуық асты безі ісігі кезіндегі Варбург эффектісі | 42 |
| 1.3.4 | Қышқыл орта жағдайындағы ісік клеткаларының энергетикалық метаболизмі | 43 |
| **2** | **ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ** | 45 |
| 2.1 | Зерттеу материалдары | 45 |
| 2.2 | Зерттеу әдістері | 45 |
| 2.2.1 | Клетка линиялары мен олардың өсу жағдайлары | 45 |
| 2.2.2 | Клеткаларды гемоцитометрде санау әдісі | 45 |
| 2.2.3 | Клетка культураларын мұздату және еріту әдістері | 46 |
| 2.2.4 | Атмосфералық төмен температуралық плазманы өндіру және клеткаларды өңдеу тәсілі | 47 |
| 2.2.5 | *Alamar Blue* талдауы арқылы цитотоксикалық әсерді анықтау | 49 |
| 2.2.6 | Колоногендік клеткалардың өміршеңдігін талдау | 49 |
| 2.2.7 | Тринокулярлық микроскптың көмегімен клеткалардың морфологиясын бағалау | 51 |
| 2.2.8 | Клеткалардың тотыға фосфорлануын өлшеу | 51 |
| 2.2.9 | Митохондриялардың мембраналық потенциалы мен морфологиялық құрылымын бағалау | 51 |
| 2.2.10 | Тотығу стресін өлшеу | 52 |

2.2.11 Клеткалардағы апоптоз процесін анықтау 52
2.2.12 Клеткаларда цитозолдық кальций деңгейін өлшеу 53
2.2.13 Клеткалық лизаттарды дайындау және белоктарды Вестерн-блот әдісімен анықтау 54
2.2.14 Жоғары дәлдікті респирометриялық талдау 55
2.2.15 Кері транскрипция және полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) талдауы 56
2.3 Нәтижелерді статистикалық талдау 57
**3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ** 58
3.1 Қуық асты безі ісік клеткаларының энергетикалық метаболизміне төмен температуралық плазманың әсері 58
3.1.1 Төмен температуралық плазма дозаларын және олардың тұрақтылығын анықтау 58
3.1.2 Төмен температуралық плазмамен өңделген әртүрлі ерітінділердің клеткаларға цитотоксикалық әсерін анықтау 61
3.1.3 Төмен температуралық плазманың қуық асты безінің қалыпты PrEC және ісік DU145 клеткаларына цитотоксикалық әсері 62
3.1.4 Төмен температуралық плазманың клеткалардағы апоптоз процесіне әсері 67
3.1.5 Митохондриялды энергетикалық метаболизмнің төмен температуралық плазмамен индукцияланған өзгерістері 71
3.1.6 Төмен температуралық плазма әсерінен қуық асты безі ісік клеткаларында туындаған тотығу стресін талдау 76
3.1.7 Цитозолдық кальций деңгейіне төмен температуралық плазманың әсері 83
3.2 Қышқыл орта жағдайында қуық асты безі ісік клеткаларының энергетикалық метаболизмін зерттеу 87
3.2.1 Қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткаларындағы экзогендік сукцинаттың тотығуын pH ортасы қышқыл буферде талдау 87
3.2.2 Қуық асты безі ісік клеткаларында сукцинаттың тотығуына фтор карбонилцианид фенилгидразон (FCCP) мен кальций мөлшерінің әсерлерін бағалау 93
3.2.3 Сукцинаттың сіңірілуінде дикарбон қышқылы тасымалдаушысы рөлінің ингибиторлық талдауы 96
3.2.4 Қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткаларында дикарбон қышқылы тасымалдаушыларының экспрессиясы 98
3.2.5 Қышқыл орта жағдайында әртүрлі клеткаларда сукцинаттың сіңірілуін салыстырмалы зерттеу 100
3.2.6 Қуық асты безінің қалыпты клеткаларында ісік клеткаларымен салыстырғандағы айқын айқаспалы кедергілерінің механизмдері 101
**ҚОРЫТЫНДЫ** 105

**ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ** 106

**ҚОСЫМША А** – Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау Министрлігінің Қазақ онкология және радиология ғылыми-зерттеу институтына DU145 қуық асты безі ісігі клеткаларының әсер ету механизмі бойынша төмен температуралық плазманы қолдану арқылы жаңа әдістемені енгізу актісі 129

**ҚОСЫМША Ә** – Оқу процесіне аяқталған ғылыми-зерттеу жұмысын енгізу туралы актісі 130

## НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР

Бұл диссертациялық жұмыста келесі стандарттарға сілтемелер жасалды:

МЕМСТ 7.32-2001. Ғылыми-зерттеу жұмысы туралы есеп. Құрылымы және дайындау ережелері.

МЕМСТ 7.1-2003. Библиографиялық жазба. Библиографиялық сипаттама. Жалпы талаптар және құрастыру ережелері.

## БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

АБТ – азоттың белсенді түрлері
АҚ – амин қышқылдары
АҚШ – Америка Құрама Штаттары
АҮФ – аденозинүшфосфат
ДМСО – диметилсульфоксид
ДНҚ – дезоксирибонуклеин қышқылы
ДТР – диэлектрлік тосқауыл разряды
Д7 – плазмалық доза 7
ж.н. – жұп нуклеотид
е.б. – еркін бірлік
ҚАБ – қуық асты безі
ҚАБІ – қуық асты безі ісігі
ҚР – Қазақстан Республикасы
ЛАТ – липидтердің асқын тотығы
НАД – никотинамидадениндинуклеотид
НАДН – никотинамидадениндинуклеотидтің тотықсызданған формасы
$H_2O_2$ – сутегінің асқын тотығы
ОБТ – оттегінің белсенді түрлері
$O_2^{\bullet-}$ – супероксид радикалы
$OH^{\bullet}$ – гидроксил радикалы
ПЖҚ – пирожүзім қышқылы
ПТР – полимеразалық тізбектік реакция
СА – стандарттық ауытқу
СО – көміртегі тотығы
СОД – супероксиддисмутаза
ТБҚ – тиобарбитур қышқылы
ТТП – төмен температуралық плазма; плазма
ҮҚЦ – үшкарбон қышқылы циклі
ФАД – флавинадениндинуклеотид
$ФАДН_2$ – флавинадениндинуклеотидтің тотықсызданған формасы
ФС – фосфотидилсерин
ЭТТ – электрон тасымалдау тізбегі
Ant – антимицин
DPI – дифенилен иодоний
DU145 – адамның қуық асты безінің метастатикалық эпителий ісік клеткалары
e – электрон
FCCP – карбонилцианид 4-(трифторметокси) фенилгидразон
FBS – бұзау ұрығының сарысуы
FITC – флуоресцеин изотиоцианат
Mal – малонат
NaCT – $Na^+$-тәуелді цитрат тасымалдаушысы

| | | |
|---|---|---|
| NaDC1 | – | $Na^+$-тәуелді дикарбон қышқылы тасымалдаушысының төмен аффинді изоформасы |
| NaDC3 | – | $Na^+$-тәуелді дикарбон қышқылы тасымалдаушысының жоғары аффинді изоформасы |
| NEM | – | N-этилмалеимид |
| NO | – | азот оксиді |
| PAGE | – | полиакриламид геліндегі электрофорез |
| PBS | – | фосфатты-тұзды буфер |
| pH | – | сутек көрсеткіші |
| PI | – | пропидий иодиді |
| PrEC | – | адамның қуық асты безінің эпителий қалыпты клеткалары |
| RAEC | – | егеуқұйрықтың аорталы эндотелий клеткалары |
| Rot | – | ротенон |
| RPMI 1640 | – | Roswell Park Memorial Institute 1640 қоректік ортасы |
| SDS | – | натрий додецилсульфаты |
| SKOV-3 | – | адамның аналық безінің эпителий ісік клекткалары |
| $\Delta\Psi m$ | – | митохондриялық мембраналық потенциал |
| $\Delta\mu H^+$ | – | протондардың ($H^+$) электрохимиялық градиенті |

# КІРІСПЕ

**Зерттеу жұмысының жалпы сипаттамасы.** Диссертациялық жұмыс төмен температуралық плазма әсерінен қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткаларының энергетикалық метаболизмінің өзгеру механизмдерін зерттеуге арналған.

**Зерттеу тақырыбының өзектілігі.** Соңғы жылдары қуық асты безі ісігі (ҚАБІ) ер адамдарда кең таралған қатерлі ісіктердің бірі болып табылады және әлемнің дамыған елдерінде негізгі орындардың бірін алады. Бүкіл дүние жүзінде жыл сайын ҚАБІ ауыратын 900 мыңнан астам науқас тіркелелі және оның 250 мыңнан астамы өлімге ұшырайды екен [1-3]. Қазақстан Республикасында (ҚР) 2007 жылы өмірінде ең алғаш рет ҚАБІ диагнозы қойылған 652 (4,2‰) ер адамдар болса, ал 10 жылдан кейін, яғни 2016 жылы бұл көрсеткіш 1545 (8,7‰) тең болды. ҚАБІ ауруынан өлімге ұшыраған ер адамдардың саны 2007 жылы 357 (2,1‰) адамды құраса, ал 2016 жылы 438 (2,9‰) адам болды [4, 5]. Бұл Қазақстандағы ер адамдардың аталған аурудан өлімге ұшырау көрсеткіштерінің жоғарылауын көрсетеді.

ҚАБІ ауруы дүние жүзі бойынша ерлер арасында өлімге ұшырағандардың саны жағынан өкпе және тыныс алу жолдары ісіктерінен кейін 2-ші орынды [6], ал ҚР бойынша өкпе, асқазан және тері ісіктерінен кейін 4-ші орынды алады [5, б. 8].

ҚАБІ ауруының молекулалық әртүрлілігі, ауру белгісі дамуының соңғы сатысында ғана көріну жиілігі, сонымен қатар, химиялық әсерлерге өте сезімтал болуы оны тиімді емдеуіне кедергі келтіреді. Біріншілік ісіктердің де, метастатикалық (екіншілік) ісіктердің де өсу қарқындылығы клетканың апоптоздық потенциалының жоғалуымен анықталады. Қазіргі кезде митохондриялардың қатысымен ісік клеткалардағы апоптоз процесінің индукциясы туралы ғылыми зерттеу жұмыстарының артуы [7, 8], ісікті емдеуде митохондриялардың потенциалды рөлін зерттеуге деген қызығушылығын тудыруда. Дегенмен, қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткаларының биоэнергетикасы мен митохондриялық қызметтеріндегі айырмашылықтарына байланысты ғылыми-зерттеу жұмыстары аз жүргізілген [9]. ҚАБІ клеткаларының апоптоз процесіне ұшырамауы, митохондриялар қызметінің биохимиялық және физиологиялық механизмдері жайлы мәліметтердің жеткіліксіз болуы, арнайы нысаналарды анықтауды (идентификация) және ісікті емдеудің тиімді әдістерін қарастыруды қиындатады.

ҚАБІ дәстүрлі химиялық терапиямен емдеу көп жағдайда тиімсіз әрі оның ауыр жанама әсерлері болады. Сондықтан, ҚАБІ емдеуге арналған тиімділігі жоғары және токсикалық әсері төмен препараттарды қалыптастыру заманауи биомедицина және онкология салаларында аса маңызды әрі өзекті мәселелердің бірі болып табылады.

Жоғары температуралық плазма және лазерлер ұлпаларды жою, тегістеу және күйдіру жолымен медицинада кеңінен қолданылады. Бұл әдістерге қарағанда, төмен температуралық плазма (ТТП) қызу әсерін тудырмайды,

сондықтан олардың әсері селективті болуы мүмкін [10, 11]. Осы құбылыстарды медициналық мақсаттарда, яғни жараның жазылуында, залалсыздандыруда, қанның ұюында және ісікті емдеуде қолдану үшін бос радикалдың көзі болатын төмен температуралық плазманың тірі ұлпамен әрекеттесу механизмін түсіну қажет.

ҚАБІ баяу өсетін ісік, бірақ көптеген басқа да ісік түрлері сияқты, метастатикалық формаға жеткен жағдайда әдетте емделмейтін ісік болып саналады [12, 13]. Қолданыстағы химиялық терапия әдістерінің елеулі жанама әсерлері бар және соңғы сатыдағы ауруларды емдеуде тиімсіз. Сондықтан, химиялық және сәулелік терапияға резистенттілікті жеңіл қалыптастыратын ісік түрлерін емдеу үшін жаңа медициналық тәсілдер қажет [14]. Атмосфералық қысымды төмен температуралық плазма қазіргі таңда прокариоттық және эукариоттық клеткалар қызметінің модуляциясы үшін қолдануға болатындығы анықталды. Төмен температуралық плазма ондағы электрондардың және ауыр бөлшектердің салыстырмалы энергетикалық деңгейлері арқылы ерекшеленеді [15]. Төмен температуралық плазманың биомедицина саласында қолдану, яғни беткі залалсыздандыруды [16], жараның жазылуы мен қанның ұюын [17, 18], антибактериалды өңдеуді [19-21], ісік клеткаларында апоптоз процесінің индукциясын [22, 23], эндотелий клеткаларының пролиферативті белсенділігін арттыруын [24] қамтиды.

Биомедицина саласында төмен температуралық плазма разряд түрімен және плазма өнімдерін клеткалар мен ұлпаларға қолдану тәсілімен сипатталады. Жиі қолданылатын разрядтар түрлеріне диэлектрлік тосқауыл разряды (ДТР), тәждік разряд және жылжымалы доғалық разряды жатады [25, 26]. Диэлектрлік тосқауыл разрядтағы плазма әдетте кГц жиілік диапазонында, айнымалы ток кернеуін беру арқылы екі электродтар арасындағы саңылауда түзіледі. Электродтардың бірі разряд аймағында ұшқын түзілуін болдырмайтын және осылайша қызып кетуден сақтайтын жоғары электр беріктігі бар диэлектрлік тосқауылмен оқшауланған болып табылады. Плазманы қолданудың екі негізгі жолы бар - тікелей және жанама өңдеу. Тікелей плазманы қолдануда ұлпалар немесе клеткалар плазмамен тікелей байланыста болады және үлгіні химиялық плазма өнімдеріне немесе плазманы өндіру үшін пайдаланылатын электр өрістің әсеріне ұшыратады, сондай-ақ клеткалардың лизисіне әкелетін және байқалған ең түбегейлі физикалық әсері болып табылады [27]. Плазманы жанама қолдану түрі клеткаларға плазмамен өңделген сұйықтықты енгізуді қамтиды және клеткалардың плазма электр өрісіне ұшырауын болдырмау үшін клеткаларға плазмамен түзілген белсенді түрлерін беруге негізделген. Кейбір ісік түрлеріне тікелей әсер ету әдісін қолдану мүмкіндігі болмаған жағдайда, плазмамен өңделген сұйықтықты енгізу арқылы, яғни жанама әсер ету әдісін қолдану анағұрлым ұтымды болып табылады.

Ісік терапиясы үшін төмен температуралық плазмамен өңдеудің потенциалын толық іске асыру үшін, плазманың клетка өлімін тудыратын нақты механизмдерін түсіну қажет. Сондай-ақ, қалыпты клеткаларға да төмен температуралық плазманың жанама әсерлерін зерттеу өте маңызды. Осыған

байланысты бұл жұмыстың негізгі мақсаты диэлектрлік тосқауыл разряды құрылғысы арқылы түзілген жанама төмен температуралық плазманың митохондрияларға тәуелді процестерге әсерін зерттеу болып табылады. Митохондриялар клеткалық метаболизм мен сигналдың жүзеге асуын ұйымдастырады, сондықтан, олар ісік терапиясы үшін болашағы үлкен нысана болып табылады [28]. Дегенмен, плазманың жоғары дозалары клеткаішілік оттегінің белсенді түрлерінің (ОБТ) жаппай түзілуіне байланысты басқа да ісіктерде апоптоз процесін тудыратыны [22, p. 674; 29] және митохондриялар ОБТ негізгі клеткаішілік көздерінің бірі екені көрсетілген [30]. Бұл мәліметтер митохондрияларға төмен температуралық плазма әсерлерінің механизмдерін анықтау арқылы ісікті емдеуде клиникалық маңызды әдістерді жетілдіруге айтарлықтай мүмкіндік бар екенін дәлелдейді.

Сонымен қатар, бұл жұмыста метаболизімі әртүрлі болып келетін қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткаларын төмен температуралық плазмамен өңдеуден кейінгі әсерлері зерттелді. Ісік микроортасын ұқсастыратын қышқыл pH жағдайында DU145 қуық асты безі ісік клеткаларының тыныс алу қызметін, сондай-ақ қуық асты безі ісік клеткаларының белсенді өсуі мен өлімге төзімділікті арттыру үшін клеткалық мембрана арқылы сукцинат және басқа да дикарбон қышқылы метаболиттерін тасымалдау кезінде $Na^+$-тәуелді дикарбон қышқылы тасымалдаушысының рөлі де қарастырылды.

**Зерттеу материалдары.** Зерттеу материалдары ретінде төмен температуралық плазманың әсеріне ұшыраған адамның қуық асты безінің DU145 ісік және PrEC қалыпты эпителий клеткалары қолданылды.

**Зерттеу әдістері.** Клеткаларды *in vitro* жағдайында өсіру, ағынды цитометрия (*BD Accurri C6*), конфокалды микроскопия (*Olympus FluoView*), жоғары дәлдікті респирометрия (*Oroboros Oxygraph-2k*), флуоресцентті спектроскопия (*BioTek Synergy 4*), микроскопия (*Leica MZ16F*, *Motic AE2000*), спектрофотометрия (*NanoDrop*), плазма өндіру әдісі (*Quinta*), Вестерн блот, ПТР және статистикалық талдау әдісітері (*GraphPad Prism*) пайдаланылды.

**Зерттеудің мақсаты мен міндеттері.** Бұл жұмыстың мақсаты қуық асты безінің ісік және қалыпты клеткаларының энергетикалық метаболизміне төмен температуралық плазма әсерінің механизмдерін зерттеу болып табылды.

Мақсатқа жету үшін келесідей негізгі **міндеттер** қойылды:

1. Төмен температуралық плазманың қуық асты безінің ісік және қалыпты клеткаларына цитотоксикалық әсерін анықтау.

2. Төмен температуралық плазма әсерінен қуық асты безінің ісік және қалыпты клеткаларында апоптоз процесі дамуының клеткалық механизмдерін айқындау.

3. Қуық асты безінің ісік және қалыпты клеткалары митохондрияларының мембраналық потенциалына және тыныс алу қызметіне төмен температуралық плазманың әсерін анықтау.

4. Қуық асты безінің ісік және қалыпты клеткаларындағы төмен температуралық плазма әсерінен туындаған тотығу стресін талдау.

5. Қуық асты безінің ісік және қалыпты клеткалары цитозолінің $Ca^{2+}$ деңгейіне төмен температуралық плазманың әсерін зерттеу.

6. Қышқыл pH жағдайында қуық асты безі ісік клеткаларының тыныс алу қызметін, сондай-ақ, клеткалық мембрана арқылы сукцинат тасымалдау кезінде дикарбон қышқылы тасымалдаушыларының рөлін зерттеу.

**Зерттеудің ғылыми жаңалығы.**

- Алғаш рет төмен температуралық плазмамен (жиілігі 250 Гц, қуаты 2,2 Вт және өңдеу уақыты 30 сек) өңделген тұзды-фосфатты буфердің (PBS) қуық асты безі ісік клеткаларына жоғары деңгейде цитотоксикалық әсер ететіндігі анықталды.

- Зерттеудегі төмен температуралық плазма әсерінен туындайтын апоптоз процесі каспазалардың белсенуі нәтижесінде жүзеге асатындығы белгілі болды. Яғни, төмен температуралық плазманың әсерінен қуық асты безі ісік клеткалары апоптоз процесіне ішкі (митохондриялармен байланысқан) және сыртқы (өлім рецепторы арқылы) жолдары арқылы ұшырайтындығы анықталды.

- Алғаш рет қуық асты безі ісік клеткаларының митохондриялық энергетикалық метаболизмінің төмен температуралық плазмамен индукцияланған өзгерістері анықталды. Яғни, таңдап алынған плазма дозаларының митохондрия мембаранасы потенциалына, клетканың тотыға фосфорлану процесі мен тотығу стресіне әсерлері зерттелді.

- Алғаш рет қышқыл орта жағдайында қуық асты безі ісік клеткаларының энергетикалық метаболизміндегі өзгерістері (мұнда сукцинаттың тотығуы және оның сіңірілу процесінде дикарбон қышқылы тасымалдаушыларының рөліне ерекше назар аударылды) зерттелді.

- Алғаш рет қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткаларында дикарбон қышқылы тасымалдаушыларының (NaDC1, NaDC3 және NaCT) экспрессиясы бағаланды.

**Жұмыстың теориялық маңызы.** Диссертациялық жұмыстың нәтижелері, атап айтқанда, төмен температуралық плазманың және қышқыл орта жағдайындағы клеткалық әсері қуық асты безі ісігінің іргелі мәселелерін түсінуге үлес қосады. Қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткалар митохондрияларының метаболиттік өлшемдерін зерттеу анти-ісікті нысана ретінде қарастыратын биоэнергетикалық сипаттарды анықтауға мүмкіндік береді. Осы зерттеуде алынған нәтижелер қалыпты және ісік клеткаларының төмен температуралық плазмамен белсендірілетін митохондрияларға тәуелді про-апоптоздық каскадтарын анықтауға мүмкіндік туғызды.

**Жұмыстың практикалық құндылығы.** Қазіргі уақытта қуық асты безі ісігінің биоэнергетикалық процестеріне арналған жұмыстар саны өте аз, дегенмен клеткалық процестердің көпшілігі энергияға тәуелді және клеткалардың өлуі мен тірі қалу механизмдері көп жағдайда митохондриялардың белсенділігімен анықталады. Бұл жұмыста алынған мәліметтер қуық асты безі ісік клеткаларының апоптоз процесіне төзімділігі механизмдерін айқындауға көмектеседі. Ісікті емдеуде клетканың

энергетикалық жүйесіне төмен температуралық плазманың әсерін зерттеу хирургиялық және химиялық терапияны толықтыратын құрал болып табылады.

Сонымен қатар, осы жұмыста қуық асты безі клеткаларындағы NaDC3 экспрессиясы қатерлі ісік трансформациясына байланысты болатыны, ал клеткалық микроортаның pH өзгерісіне тәуелсіз екендігі көрсетілді. Сондай-ақ, қуық асты безі клеткаларында сукцинат ағыны NaDC3 арқылы тасымалданатыны анықталды. Бұл позитронды-эмиссиондық томография негізінде глюкозаны қолдану сияқты, қышқыл микроортада гликолитикалық емес ісіктерді бейнелеу негізіндегі молекулалық диагностикалауы үшін пайдалану потенциалына ие. Таңбаланған сукцинатты пайдалану ауру сатылары мен химиялық терапияға жауабын болжау үшін сукцинат ағындарын анықтау технологиясын бере алады. Сонымен қатар, сукцинаттың дикарбоксилатты тасымалдаушы-жанама сіңірілуі қалыпты қуық асты безі клеткаларына ешқандай әсер етпейтін ісікке қарсы терапия үшін нысана мен жаңа болжамдық биомаркер беруі мүмкін.

Зерттеу жұмысының нәтижелері ҚР Денсаулық сақтау Министрлігінің Қазақ онкология және радиология ғылыми-зерттеу институтына DU145 қуық асты безі ісігі клеткаларының әсер ету механизмі бойынша төмен температуралық плазманы қолдану арқылы жаңа әдістеме енгізілді (2018 жылдың 16 қарашадағы № 28-2018 ендіру актісі – Қосымша А).

Сонымен қатар, алынған нәтижелер медициналық биология бағытындағы жоғары оқу орындарының студенттеріне, магистранттары мен докоранттары үшін клеткалық биология, онкология, физиология, патофизиология, биоэнергетика, биохимия, биомедицина және биофизика пәндері бойынша дәрістер курсына енгізілуі мүмкін. Атап айтқанда, олар Биология және Биотехнология мамандықтары бойынша әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің студенттері үшін «Биоактивті заттардың ағзаға физиологиялық және биофизикалық әсер ету механизмдері» оқу бағдарламасына енгізілді (Оқу процесіне аяқталған ғылыми-зерттеу жұмысын енгізу туралы актісі, 2018 жылдың 24 қазанындағы № 3 хаттамасы – Қосымша Ә).

**Қорғауға ұсынылатын негізгі қағидалар.**

1. Төмен температуралық плазма дозасына және экспозиция ұзақтығына байланысты адамның қуық асты безі клеткаларының екі типіне де (DU145 ісік және PrEC қалыпты) цитотоксикалық әсер етеді.

2. Төмен температуралық плазмамен өңдеу DU145 ісік және PrEC қалыпты клеткаларында апоптоз процесін тудырады.

3. Төмен температуралық плазмамен өңдеу қуық асты безінің DU145 ісік және PrEC қалыпты клеткаларының тыныс алу қызметтеріне кері әсер етеді. Алайда, 24 сағат ішінде биоэнергетикалық белсенділігі азайған ісік клеткаларына қарағанда қалыпты клеткаларда тотыға фосфорлану қалпына келетіндігі көрсетілді.

4. Төмен температуралық плазмамен өңдеуден туындаған оттегінің белсенді түрлерінің түзілуі митохондрияға тәуелді емес.

5. Төмен температуралық плазмамен өңдеуден кейін цитозолдағы $Ca^{2+}$ иондарының деңгейі клеткалардың түріне байланысты өзгереді.

6. DU145 ісік клеткаларында қышқыл pH жағдайында сукцинаттың белсенді тотығуы жүрді. Сукцинаттың тасымалдануы плазмалық мембрананың $Na^{+}$-тәуелді дикарбоксилатты тасымалдаушысы - NaDC3 арқылы болатыны анықталды.

**Тақырыптың зерттеу деңгейі.** Диссертациядағы зерттеу жұмыстары физиологиялық, клеткалық және молекулалық деңгейде орындалды.

**Жұмыстың ғылыми зерттеу бағдарламасымен байланыстылығы.** Бұл жұмыс қуық асты безі ісігін зерттеу үшін «*Cornelius Beukenkamp*» (2013-2015) және «*Mary DeWitt Pettit Fellowship*» (2013-2015) Фондтарының қолдауымен Дрексель университетінің хирургия кафедрасының митохондрия патофизиологиясы зертханасы базасында жасалды (жоба жетекшісі Дрексель университетінің профессоры З.С. Орынбаева). Сонымен қатар, биофизика және биомедицина кафедрасының «Заманауи биофизика және биомедицинаның өзекті мәселелері» (2013-2018) атты инициативтік тақырыбы бойынша орындалды.

**Қорғауға ұсынылатын ғылыми жұмыс нәтижелерінің жасақталуына қосқан диссертанттың жеке үлесі.** Жұмыстың барлық негізгі нәтижелері автордың жеке қатысуымен орындалды. Автор сонымен қатар, тақырыпқа қатысты медициналық, физиологиялық және басқа да көрсеткіштерді дайындап, әдебиет және өндіріс мәліметтерін жинақтаған. Диссертацияда баяндалған ғылыми жаңалықтар, негізгі нәтижелер мен қорытындылар диссертанттың ізденісі нәтижесінде алынды.

**Зерттеу нәтижелерін сынақтан өткізу және енгізу.** Диссертациялық жұмыстың нәтижелері мен негізгі қағидалары төмендегідей халықаралық ғылыми конференциялар мен симпозиумда баяндалды және талқыланды:

- «Фараби әлемі» студенттер мен жас ғалымдардың халықаралық ғылыми конференциясы (2013, 2014, 2017, 2019, Алматы Қазақстан);
- Халықаралық ғылыми конференция «Research Day 2014» (2014, Philadelphia, USA);
- Халықаралық ғылыми конференция «Gordon Research Conferences, Bioelectrochemistry» (2014, Biddeford, USA);
- Халықаралық ғылыми конференция «The 1st International Workshop on Plasma for Cancer Treatment» (2014, Washington, D.C., USA);
- Халықаралық симпозиум «International Symposium on molecular medicine and infectious disease. Cancer biology and neoplastic disease» (2014, Philadelphia, USA);
- Халықаралық Фараби оқулары (2015, 2017, Алматы, Қазақстан);
- Халықаралық ғылыми конференция «Fourth AACR International Conference on Frontiers in Basic Cancer Research» (2015, Philadelphia, USA).

**Басылымдар.** Диссертациялық жұмыстың негізгі мазмұны баспадан шыққан 19 ғылыми еңбектерде көрсетілген, соның ішінде 2 мақала мен 1 тезис *Thomson Reuters* және *Scopus* базасындағы импакт-факторы бар халықаралық

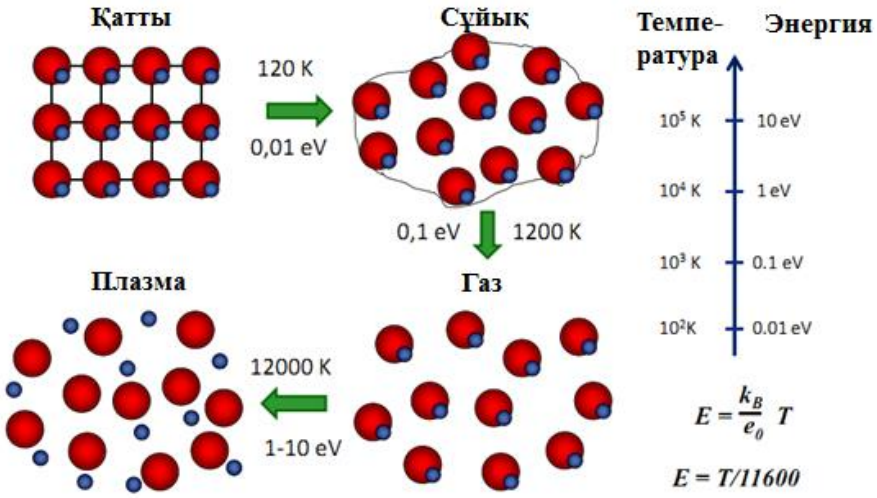
журналдарда; 4 мақала Қазақстан Республикасы Білім және Ғылым саласындағы бақылау Комитеті ұсынған республикалық ғылыми басылымдарда; 1 мақала республикалық журналда; 4 тезис халықаралық конференциялар мен симпозиумдар жиынтығында және 7 тезис Қазақстан Республикасының халықаралық конференциялар материалдарында жарияланды.

**Диссертацияның құрылымы.** Диссертациялық жұмыс 131 мәтіндік бетте жазылды және нормативтік сілтемелер, белгілеулер мен қысқартулар, кіріспе, әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері және оларды талқылау, қорытынды, 320 пайдаланылған әдебиеттер тізімінен тұрады, құрамында 36 сурет, 4 кесте және 2 қосымша бар.

# 1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ

## 1.1 Плазма жайлы түсінік

Плазма - иондалған күйдегі газ болып табылады. Бұл заттар күйлерінің (қатты, сұйық, газ, плазма) жіктелуінде заттың төртінші күйі және әлемдегі заттың 99% құрайды (1-сурет). Плазманы құрайтын бөліктерге электрондар, бос радикалдар, оң және теріс иондар, фотондар және газ атомдары мен молекулалары жатады [31-33]. Алғаш рет 1879 жылы британ химигі, әрі физигі *William Crookes* оны “сәулелі зат” ретінде сипаттады. 1928 жылы *Irving Langmuir* «Плазма» терминін енгізді, ол грек тілінде “белгілі бір заттан түзілген” деген мағынаны білдіреді. *Irving Langmuir* плазманы сипаттауда жоғары иондалған газдардың көп компонентті қоспасы ретінде медицинадағы қан плазмасын еске түсірді [34, 35].




Сурет 1 – Қатты заттың плазмаға айналу сатылары [32, p. 6]

Плазма температура мен қысымның аса кең диапазон аралығында болуы ықтимал. Ол төмен қысымда немесе атмосфералық қысымда энергияның газ тәрізді ортаға қосылуы арқылы түрлі тәсілдермен алынуы мүмкін. Атап айтсақ, химиялық, сәулелік, механикалық, термиялық, ядролық кернеу беру негізінде немесе электромагниттік өріс арқылы және осы тәсілдердің өзара комбинациялары арқылы алуға болады [31, p. 54]. Электрлік өрістің күші мен импульс ұзындығы сияқты газ қоспалары мен температура плазманың нақты құрамын анықтайды [36; 26, б. 208].

### 1.1.1 Плазманың түрлері және олардың медицинада қолданылуы

Плазма жоғары және төмен температуралық болып екі топқа жіктеледі. Құрамындағы иондардың, электрондардың және бос бөлшектердің температурасы бірдей болатын плазма жоғары температуралық плазмаға жатады. Ал төмен температуралық плазма екі топқа жіктеледі: термалды және термалды емес плазма (салқын плазма) [31, p. 54-55].

Плазма температурасы оның құрамындағы бөлшектердің орташа энергиясымен өлшенеді. Плазманың басым бөлігі термодинамикалық тепе-теңдікке тәуелсіз болады. Оның бөлшектері түрлі температурада және әртүрлі бос күйде болуымен сипатталады. Электрондардың температурасы ауыр бөлшектердің температурасынан едәуір жоғары. Мұндай плазмада иондалған және химиялық процестер электрондардың температураларымен анықталады және газ температурасына сезімталдылығы төмен болады. Плазманың осындай түрін термалды емес плазма деп атайды [37]. Ал термалды плазманың қасиеттері термалды емес плазманың қасиеттеріне қайшы. Оны құрайтын бөлшектердің температуралары өзара тең немесе соған жуықтау болу себебінен, қуат пен жылу бөлінетіндігімен сипатталады. Әйтсе де, ол қозу әсерінің төмен таңдауына және газдың жоғары температурасына ие болады, ал бұл оның қолдануына шек қояды. Ал, термалды емес плазма жоғары таңдауына және плазмахимиялық реакциялардың тиімді өту қасиетіне ие болады [38, 39].

Төмен температуралық плазма түрлі электр разрядтардың немесе электрондық шоғырдың көмегімен пайда болады. Осы жағдайда электр энергиясының негізгі бөлігі газ ағынының температурасына емес, энергиялық электрондардың түзілуіне жұмсалады. Бұл электрондардың атмосфералық газы және электродтарымен өзара әрекеттесуіне әкеледі. Нәтижесінде атомдар мен молекулалардың, бос радикалдар мен иондардың иондау процесі арқылы қосымша электрондардың қозған күйлерінің туындауына ықпал етеді. Қозған бөлшектер мен белсенді радикалдар зиянды компоненттердің молекулаларын тотықтырады және тотықсыздандырады немесе ыдыратады. Төмен температуралық плазмаға қарағанда термалды плазмада өзара әрекеттесудің негізгі механизмі көп мөлшерде жылу шығарумен сипатталады. Ал бұл атмосфералық газдың жоғары температурасын талап етеді. Сонымен, төмен температуралық плазмада иондар, бос бөлшектер мен компоненттер бөлме температурасы жағдайында болады. Бұл ерекшелік төмен температуралық плазманы қыздыруға сезімтал материалдарды, соның ішінде полимерлер мен биологиялық ұлпаларды өңдеу үшін қолдануға мүмкіндік береді [31, p. 63; 37, c. 44]. Тепе-тең емес плазманы технологиялық процестерде қолдану үшін разрядтың негізгі қағидаларын түсіну қажет, ал бұл өз алдына плазманың параметрлерін басқаруға септігін тигізеді. Төмен температуралық плазманы медицинада қолдану ерекше қызығушылық туғызады. Соңғы зерттеулер мұндай плазманың тірі ұлпаларда микроорганизмдерді тиімді түрде инактивациялау, қанның ұйығыштығын жылдамдату, клеткалардың пролиферациясын ұлғайту және жараның тез жазылу қасиеттеріне әкелетінін көрсетті [40].

Төмен темпаратуралық плазма мен лазерлер қыздыру арқылы ұлпалардың өсуін тоқтату, қалпына келтіру және күйдіру үшін медицинада кең түрде қолданылады. Осы әдістерді ескеретін болсақ, термалды емес плазма қызу әсерін тудырмайды, сондықтан олардың әсері селективті болуы мүмкін. Осыған байланысты бұл құбылыстарды медициналық мақсаттарда, яғни жараны емдеуде, залалсыздандыруда, қанның ұюын және ісікті емдеуде қолдану үшін

бос радикалдың көзі болатын төмен температуралық плазманың тірі ұлпамен әрекеттесу заңдылықтарын зерттеу өзекті мәселе болып табылады [11, p. 1].

Плазмалық медицина, биомедициналық физиканың пәнаралық зерттеулерінің жаңа саласына жатқызылады [40, p. 503]. Төмен температуралық атмосфералық плазманы әртүрлі медициналық сұрақтардың (залалсыздандыру, әртүрлі аурулар мен жараларды емдеуде және ұлпалардың регенерациясында) шешімін табуда жаңа әдіс ретінде қолдануды қарастыру қажет. Олардың ішінде қатерлі ісікке қарсы емдеуді қолдану ең өзекті мәселелердің бірі болып табылады. Ісікке қарсы стратегияларға хирургиялық ота, сәулелік және химиялық терапия кіреді. Көп жағдайда, қарапайым ісік ұлпалары кәдімгі хирургиялық ота арқылы алып тасталынады, бірақ ісік клеткаларының аз санының қалып қоюынан қайта пайда болу қаупі туындауы мүмкін. Емдеу және қосымша емдеу ретінде, көп жағдайда сәулелік терапияны және химиялық терапияны қолданады, бірақ осы дәстүрлі әдістердің өзіндік шектеулері болады. Соңғы зерттеулер төмен температуралық атмосфералы плазманың ісік клеткалары өлімін тудыратын әдіс екенін көрсетті [41].

### 1.1.2 Төмен температуралық плазманың химиясы және оның құрамындағы бөлшектердің клеткаларға ықпалы

Атмосфералық төмен температуралық плазманың зарядталған бөлшектері, түзілген оттегінің және азоттың белсенді түрлері, УК-фотондары және жоғары электр өрістері көмегімен бактериалық және сүтқоректілер клеткаларымен өзара әрекеттеседі [42]. Плазма қасиеттеріне байланысты, оның емдік қолданулары регенеративті/деградациялық процестерін (жара жазылуында, яғни стандартты емдеу тәсілдеріне жауап қайтармайтын, мысалы диабеттік зақымдалулар үшін/хирургияда, стоматологияда ауыз қуысын залалсыздандыру және ісікке қарсы терапия) жетілдіру жағына бағытталған [43, 44]. Сүтқоректілер клеткаларына (әсіресе ісік клеткаларына) тиімді әсер ету үшін кейбір ғалымдар өздерінің тәжірибелерінде химиялық белсендірілген салқын плазманы (He және $O_2$ газ қоспасын) қолданады [45].

Төмен энергиялық плазма бөлшектерінің, яғни иондар, радикалдар және т.б. қоршаған ауа молекулаларымен өзара әлсіз байланысы болады. Энериялық электрондар оттегінің белсенді түрлерінің түзілуін тудыратын бір-бірімен соқтығысу арқылы пайда болған молекулалық диссоциацияларды түзеді. Осы әрекеттесу процестерінен кейін, электрондардың энергиясы кеми түседі [46].

ОБТ түзілу процестері молекулалық оттегінің ($O_2$) диссоциациялануы мен атомарлық оттегінің түзілуінен басталады:

$$e + O_2 \rightarrow O^- + O \qquad (1)$$

Атомарлық оттегінің бактериялар мен жануарлар клеткаларына әсер ету процесі жайлы ақпараттар өте аз. Атомарлық оттегінің плазмада, басқа да оттегінің белсенді түрлерімен бірге болуы, төменгі кіріс энергиясы кезінде *Bacillus globigii* спораларының жойылу жылдамдығының ұлғаюына әкелетіндігі

көрсетілген [47]. *F. Sohbatzadeh* және т.б. атомарлық оттегінің *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* және *Bacillus cereus* сияқты бактерияларды жоғары клиникалық маңыздылығымен жоятындығы жайлы тиімділігін көрсетті [48]. Атомарлық оттегі, басқа да көптеген бактериялық штаммдарды инактивациялаумен қатар, оның қоректік ортаны, беттік материалдар мен ауаны залалсыздандыруда қолданысы маңызды рөл атқарады [15, 29, p. 80; 49-51]. Бұл қасиеті оны, тіпті залалсыздандырудан соң хирургиялық имплантаттарды бактериялық клеткалар ластауынан тазалауда оңтайлы етеді [52].

ОБТ түзілу процесі атомарлық оттегінің RH биоорганикалық молекулаларымен қосылуы арқылы R және OH радикалдар түзуі негізінде жүзеге асады [50, p. 1-9; 51, p. 5-18; 53]:

$$O + RH \rightarrow R^{\bullet} + {}^{-}OH \qquad (2)$$

Гидроксильді радикал тотығу тізбегінің реакциясын жалғастыратын өте белсенді оттегінің түрі болып саналады.

Алайда, оттегінің белсенді түрлері арқылы пайда болған атомарлық оттегі қосалқы түрде бактериаларды жою қызметін атқарады. Сондай-ақ сүтқоректілер клеткаларымен қатар ісік клеткаларында да апоптоз немесе некроз процестерін тудырады [50, p. 1-9; 51, p. 5-18; 53].

Бос радикалдар өте белсенді және тұрақсыз химиялық түрлер болып табылады. Олар әртүрлі органикалық немесе бейорганикалық қоспалармен соның ішінде клетка мембраналары мен нуклеин қышқылдардың құрылымында маңызды рөл атқаратын молекулалармен әрекеттеседі. Сонымен қатар, олар тәуелсіз катализдік реакцияларды тудырады және бос радикалдар түзуге ұмтылатын реакциялар тізбегін жалғастырады [45, p. 64].

Ең алдымен, супероксид-анион гидратталған электрондардан немесе плазмамен өңделген сұйық орта беткейінен түзіледі:

$$e_{(H_2O)} + O_{2(H_2O)} \rightarrow O_2^{-}{}_{(H_2O)} \qquad (3)$$

Сүтқоректілер супероксидті тез арада одан азырақ зиянды затқа, яғни сутегінің асқын тотығына айналдырады, бұл "супероксид дисмутация" реакциясы арқылы жүреді және супероксиддисмутаза (СОД) деп аталатын ферментпен катализденеді:

$$2O_2^{-} + 2\,H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (4)$$

$H_2O_2$ $O_2^{-}$ қарағанда тұрақтылау және бұл тұрақтылық биологиялық мембраналарда оның диффузиялығына мүмкіндік береді ($O_2^{-}$ жағдайына қайшы). Алайда, $H_2O_2$ мен $O_2^{-}$ салыстырған кезде, $H_2O_2$ әлсіздеу оксидантты агент болып табылады.

Содан соң, сутегінің асқын тотығы Фентон механизімі арқылы гидроксильді радикалға айналады:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH + OH^{-} + Fe^{3+} \quad (5)$$
$$Fe^{3+} + O_2^{-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2 \text{ [29, p. 853]} \quad (6)$$

Гидроксильді радикалдар содан кейін, тотығу тізбегіне әкелетін көршілес органикалық қосылыстармен реакцияға түсуі мүмкін, нәтижесінде ДНҚ молекулаларын, клеткалық мембраналар мен клеткалардың басқа да компонеттерін де жоюы ықтимал (мұндағы R қандай да бір органикалық молекула):

$$^{-}OH + RH \rightarrow R^{\bullet} + H_2O \quad (7)$$
$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow RO_2 \quad (8)$$
$$RO_2 + RH \rightarrow RO_2H + R^{\bullet} \text{ [51]} \quad (9)$$

Супероксид суда азотты оттегімен (NO) реакцияға түсіп, басқа реактивті оксидативті агентті, яғни пероксинитритті ($OONO^{-}$) түзеді. Сонымен қатар, $ONO2^{-}$ сутегінің асқын тотығы мен нитрит реакциясы арқылы да түзіледі.

$$O_2^{-} + {}^{\bullet}NO \rightarrow ONO_2^{-} \quad (10)$$
$$H_2O_2 + NO_2^{-} \rightarrow ONOO^{-} + H_2O \quad (11)$$

ДНҚ мен белоктар сияқты маңызды молекулалық түрлер, пероксинитритпен индукцияланған тотығу зақымдануларынан зардап шегеді, пероксинитрит әдетте оксидантты және нитраттаушы агент ретінде әсер етеді.

Бейтарап реактивті түрлер клеткалық мембрана құрылымдары аясында маңызды тотығу әсерлерін түзеді. Дегенмен, өте реактивті O, $^{-}OH$ және $O_2^{-}$ сияқты кейбір бейтарап бөлшектер плазма ішінде немесе шегіне жақын жерде ғана тиімді болуы мүмкін, себебі олардың өмір ұзақтығының өте қысқа болуына байланысты. Керісінше, •NO мен $NO_2^{-}$ реактивтілігі төменірек, бірақ өмір сүру мерзімі ұзағырақ және олар сол өндірілген жерден бөлінген аймақтарда тиімді болуы мүмкін [29, p. 770-786].

ОБТ үлкен мөлшеріне ұшыраған клеткалар клеткалық лизиске ұшыратқан уақытта клеткалық циклдің кезеңіне байланысты, олардың полиферациясын тоқтатумен немесе клеткалық өлім (апоптоз немесе некроз процестері) сияқты жауап реакциясын көрсетеді. $H_2O_2$ және ${}^{\bullet}NO$ төмен концентрациялары клеткалық пролиферацияны арттырса, ал жоғары концентрациялары апоптоз процесін тудыртатын клеткалық және ұлпалық жарақатқа ықпал етеді. ${}^{\bullet}NO$ концентрацияға тәуелді түрде әр түрлі клеткалар түрлеріндегі сутегінің асқын тотығымен жанама түрде туындаған апоптоз процесін тежеуі немесе күшейтуі мүмкін. ОБТ ДНҚ молекулалардың, белоктардың, липидтердің, көмірсулардың спонтандық зақымданудың негізгі себебі болып табылады. ОБТ сигнал беруінің жалпы екі механизмі бар: сигналдық жолдарға қатысатын белоктардың клеткаішілік тотығу жағдайы және тотыға модификациялану өзгерістері [50, p. 35].

$O_2^-$ және $H_2O_2$ клеткааралық адгезияның жоюлуына және актинді цитоқаңқаның қайта құрылуына ықпал етеді. Эпителий және эндотелий клеткаларына жасалған зерттеулер, экзогенді ОБТ-нің әсіресе клеткааралық топтарына әсер ететіндігін көрсетті. Демек, ақпарат цитоқаңқаның құрамдас бөліктеріне беріледі. Эпителиалды клеткаларды $H_2O_2$-мен өңдеу кадгерин (гликопротеинды адгезиялық молекула) интернализациясы мен окклюдин (клеткаааралық дәнекер құрылымдарына қатысатын трансмембранды белок) экспрессиясы деңгейінің төмендеуіне әкеледі. ОБТ актин жібшелерін тікелей (–СООН өзгеруі және осыдан актин мен басқа да белоктардың арасындағы өзара байланыс өзгереді) немесе жанама (оксидативті стресс АҮФ тез төмендеуіне және актин жіпшелерінің үзілуіне әкеледі) түрде өзгертеді. Бұл процесс актин жіпшелерінің қайта ұйымдастырылуы мен клеткалардың морфологиялық өзгерістері (мөлшері мен пішіні) негізінде жүреді. Сонымен қатар, ОБТ клеткааралық саңылаулардың туындауына әкеледі. Осы барлық факторлар клеткааралық адгезияның өзгеруіне және одан әрі тамыр өткізгіштігінің ұлғаюына ықпал етеді [54].

Экзогенді ОБТ мембраналық рецепторларды және одан кейінгі сигналдық каскадтарды белсендіре алатын болса, ал эндогенді ОБТ тек трансдукция жолдарына ғана қатысады. TNF ісік некрозы факторының рецепторлары мен Fas (CD95) "Өлім рецепторлары" протеинкиназалық және MAP-киназалық сигналды жолдарды белсендіру арқылы апоптоз процесін тудырады. Протеинкиназа С (PKC), митоген белсендірілген протеинкиназа (MAPK) және клеткааралық сигнал-реттелетін киназа (ERK) – апоптоз процесіне қатысатын ферменттер тобы. Бұл белоктар эндогенді немесе экзогенді ОБТ арқылы белсенеді [52, 55].

Сондай-ақ, ОБТ мембрананың иондық тасымалдау жүйесіне, яғни иондық каналдар мен сорғыларға, ионалмастырушылар мен ко-транспортерлерге ықпалын тигізеді. Клетка гомеостазындағы иондардың ($Na^+$, $Ca^{2+}$, $K^+$, $Cl^-$) өзгерісі мембраналық транспорттық механизмдердің тежелуін, не белсенуін тудырады [56].

ОБТ әсерінен хроматиннің ыдырауы арқылы алынған геномдық зақымданулар кейбір сигналдық каскадтар, соның ішінде поли (АДФ-рибоза) полимераза (PARP) арқылы апоптоз процесіне алып келеді. Бұл ядролық фермент ДНҚ репарациясына қатысатын белоктарға катализ ретінде поли-АДФ-рибозалар қосу арқылы ДНҚ фрагменттерін белсендіреді.

ДНҚ молекулаларының жойылу кезінде PARP қызметі өзінің НАД субстратын шамадан тыс азайтады әрі қайта синтезделген НАД АҮФ төмендеуіне әкеледі. АҮФ төмендеуіне байланысты соңғы энергияның жойылуы клеткалық некроз процесіне әкеледі [57]. Сублеталды тотығу стресі хроматиннің деградациясын тек жартылай ғана тудырады. Бұл мәлімет клеткалардың тірі қалуында жоғары мутагенді қатерді қамтиды [58].

Сонымен, белсенді түрлер негізінен, синглетті оттегі (О), гидроксил радикалы ($OH^•$), асқын тотығы анионы ($H_2O_2^-$) және озон ($O_3$) сияқты түрлерден тұрады [59]. Осы түрлердің барлығы, әдетте, белгілі бір деңгейде ағзада

түзіледі. Алайда, олар дененің қалыпты деңгейлерінен асып кеткен кезде тотығу стресі орын алады [60]. Мәселен, мұндай құбылыс фибробластарда жанама плазмалық өңдеуден соң байқалған [61]. Плазмалық көздерден шығатын белсенді түрлер негізінен электрондардың өзара соқтығысуы арқылы жүзеге асатын қозу мен диссоциациялану жолдарымен туындайды. Олар барлық плазма-беттік өзара реакцияларда маңызды қызмет атқарады [62]. Жоғарыда көрсетілген кейбір оттегінің белсенді түрлері биологиялық материямен реакцияға түсе алады. $OH^{\bullet}$ радикалдар плазмалық мембрананың қанықпаған май қышқылдарына әсер етеді [63]. Клеткалардың плазмалық өңделуі, тіпті липидтердің асқын тотығуына әкелуі мүмкін деген ұсыныстар айтылған [64, 65]. Белоктардың амин қышқылдары оттегі атомдары мен метатұрақты оттегі молекулаларымен тотығуына сезімтал болып келеді [66]. Сонымен қатар, тотығу стресі клеткалық адгезиясы молекулаларының функцияларында айрықша және айқын білінетін өзгерістерге әкелуі мүмкін екенін, сондай-ақ, тотығу стресі, апоптоздық және некроздық клетка өліміне әкелетін жолдарында орталық рөл атқаруы мүмкін екенін атап өту маңызды болып табылады [67]. Түзілеген белсенді түрлер тіпті клеткалардың ферментативті белсенділігін өзгертуі мүмкін, өйткені өлшенетін метаболттік өзгерістер дәлелденгендей, плазмалық өңдеуден тірі қалған бактериялық клеткаларда болған [68].

Әдебиеттерде басылымдардың басым көпшілігі, белсенді түрлердің клеткаларда байқалатын төмен температуралық плазма әсерінде маңызды рөл атқаруы мүмкін деп есептейді [49, p. 053309; 62, p. 81; 69-84]. Алайда, әрбір белсенді түрлердің нақты рөлі жайлы бірыңғай пікір жоқ. Кейбір басылымдар, қандай түрлердің маңызды рөл атқарғандығын болжамды анықтаған болатын. Анықталған негізгі түрлер $NO^{\bullet}$ [74, 78, 79, 85, 86], атомарлық O [49, 71, 77, 86, 87], $OH^{\bullet}$ [81, 86, 87], $O_3$ [49], метатұрақты $O_2$ [ 49], $H_2O_2$ [74] және $O_2^-$ [78] болып табылады. *Hahnel* [81], *Muranyi* [88] және *Maeda* [89] өздерінің әріптестерімен жүргізген зерттеулері плазма қалыптастыратын газ ретінде пайдаланылатын синтетикалық ауаның салыстырмалы ылғалдылығы (плазманың химиялық құрамына және түзілген белсенді түрлерге әсер ететін) бактериялар залалсыздандыруына әсер ететінін көрсетті. *Raballand* және оның әріптестері [90] атмосфералық қысым кезінде бактериялар спораларының залалсыздандырылуы O атомның әсеріне ғана емес, сонымен қатар, атомдардың, иондардың және УК фотондардың синергетикалық әсеріне байланысты деген қорытындыға келді [90, p. 115212] .

### 1.1.3 Төмен температуралық плазманың сүтқоректілер клеткаларына әсері

Төмен температуралық плазмамен өңдеуден өткен клеткалар жабысу қабілетін жоғалтады. Төмен температуралық плазмаға жауап ретінде сүтқоректілер клеткаларында кейбір клеткалық өзгерістер жүреді, мысалы ДНҚ молекуланың, митохондрияның, плазмалық мембрананың зақымдануы және т.б. Төмен температуралық плазманың әртүрлі көздері оттегі мен азоттың белсенді түрлерін және зарядталған бөлшектерін түзеді. Бұл элементтер

клеткаішілік немесе клеткадан тыс түрде апоптоз процесін қоздырады. Плазманы қолданудың мұндай түрі ісікке қарсы терапия үшін қолдану болашағын көрсетеді [41, p. 6].

Атмосфералық қысымды төмен температуралық плазманың сүтқоректілер клеткаларына әсерін бірнеше ғалымдар зерттеген [65, p. 3508; 79, p. 599; 91-104]. Бұл зерттеулерде төмен температуралы атмосфералық қысымды плазманың екі негізгі түрлері қолданылды, атап айтқанда плазмалық ағындар немесе инелер құрылғысымен тудырылған гелий плазмасы және диэлектрлік тосқауыл разряды (ДТР) құрылғысымен өндірілетін атмосфералық плазмасы. *In vitro* жағдайында фибробласттарға, эндотелий және бірыңғай салалы бұлшықет клеткаларына жасалған зерттеулер төмен температуралық плазманың әсері мөлшеріне және әсер ету ұзақтығына тура пропорционал екенін анықтаған. Клеткаларды плазманың бәсең жылдамдығында ұстағаннан соң клетканың ыдырауы, яғни клетканың адгезиясы және ажырауы байқалды [65, p. 3513; 79, p. 599; 93-95]. Плазмалық өңдеуден кейін жекешелініп алынған клеткалар өміршеңдігін жоймайды, пластинаның беткейіне қайта жабысады, қысқа инкубациялық уақыттан кейін пролиферацияланады. Сонымен қатар, клеткалық адгезияның өзгеруі, гелий плазмасының қысқа уақытта әсері клеткалық мембрананың уақытша өткізгіштігіне [65, p. 3510-3513] және клеткалар миграциясының тежелуіне әкеледі [95, p. 1]. Плазманың жоғары қарқындылығымен өңдеу немесе ұзақ уақыт экспозициялау әр клетканы апоптоз немесе некроз процестеріне ұшыратады [79, p. 603; 93-95]. Клетканың өлімін тудыратын гелий плазмасының әдісі плазманың мөлшеріне және сәулелендіру жағдайына байланысты [50, p. 1]. *Stoffels* өзінің зерттеуінде модель ретінде қытай атжалманының аналық жұмыртқа клеткасын (CHO-K1) алды. Олар осы клеткаларды ине тәрізді электрод ұшының айналасында тудырылған радиожиілікпен басқарылатын төмен қуаттағы аз көлемдегі төмен температуралық плазмамен әсер етті. Сөйтіп олар, қуаты 0,2 Вт жоғары және әсер ету уақыты 10 секундтан көп болған жағдайда некроз процесі жүретінін байқады. Ал, плазманың төмен мөлшерінде әсер ету апоптоз процесіне әкелетіні анықталды. Егер қуаттың деңгейі мен әсер ету уақыты шамамен 50 мВт және 1 секундқа дейін қысқартылса, онда сәйкесінше клеткалар үлгіден біртіндеп ажырай бастайды, дөңгелек пішінге айналады және апоптоз процесіне шалдықпайды. Сонымен бірге, әсер етілген үлгіде некрозды емес аймағы байқалды [105]. *Stoffels* және оның әріптестері, басқа да екі типті клеткаларда, яғни эндотелий клеткаларда және бірыңғай салалы бұлшықет клеткаларда олардың ажырауын тудыра алды. Бұл ірі қара малдың қолқа тамырының эндотелий клеткалары және егеуқұйрықтың қолқа тамырының біріңғай салалы бұлшықет клеткары болды. 10 секундтық қысқа уақытты экспозиция клетка ажырауының некрозсыз жүретіні анықталды [79, p. 601]. *Yonson* және тағы басқалар [65] да, адамның гепатоциттерінің (HepG2) ажырауын шағын атмосфералық қысымды жалынсыз (ұшқындау) разрядты плазмалық шырақ арқылы көрсетті. *Shashurin* және тағы басқалар [95] да, тышқанның тері фибробласт клеткаларының ажырауын атмосфералық ағындардың төмен

температуралық плазмасы арқылы байқаған. Ал *Kieft* өзінің әріптестерімен [94] 3T3 тышқанының фибробласт клеткаларында апоптоз процесін тудыра алды. *Kalghatgi* және басқалар [92] ДТР плазма құрылғысын қолдану арқылы түзілген плазмаға ұқсас клетканың жауабын бақылады. Плазманың қарқындылығына және әсер ету уақытына байланысты ДТР плазмалық өңдеуі эндотелий клеткаларда апоптоз не некроз процестерін тудырды. Сонымен қатар, авторлар клетка пролифирациясының индукциясы плазманың төмен қарқындылығымен өңдегеннен кейін бес күн өткен соң жүретінін көрсетті.

Клеткалық жауапты индукциялайтын плазмалық агенттерді анықтау плазма-клетка әрекеттесулерінің механизмдерін түсінуінде маңызды мәні бар. Бұл ақпарат терапиялық мақсатта қолдану үшін плазманың арнайы міндеттерін дамытуға негіз болады. Антиоксиданттарды қоректік ортаға қосу плазмамен өңделген клеткалардың бөлінуіне кедергі келтірмеді, ал бұл, осы процестегі оттегінің белсенді түрлерін түзетін плазманың роліне қарсы дәйектемелерді ұсынады [94, p. 1331-1336]. *Stoffels* және оның әріптестерімен [79] ұсынылған соңғы нәтижелер осы тұжырымға қосымша қолдау береді. Бұл зерттеулерде, плазманың қолданылуы эндотелий және бірыңғай салалы бұлшықет клеткаларына клетка культураларының көпіршікті мембранасы арқылы жүргізілді. Бұл мембрана оттегінің және азоттың белсенді түрлерін өткізеді, ал олардың осы мембрананың қарама-қарсы жағында өсірілген клеткалармен тікелей байланысы зарядталған бөлшектер мен УК-фотондардың өтуін шектейді. Осы тәжірибелік жағдайларда клетканың ажырауы байқалмады. Дегенмен, мембрана плазмамен индукцияланған клетканың апоптоз процесін тежемеді. Авторлар осы нәтижелерге негізделіп, олардың бұған дейінгі тәжірибелерінде [93] байқалған клетканың ажырауы, плазма-клетканың электростатикалық өзара қатынасы ретінде түсіндірілуі тиіс деп шешті. Плазмамен тудырылған оттегінің және азоттың белсенді түрлері плазмамен индукцияланған клетка апоптозының ең ықтимал себебі болып саналады. *Kalghatgi* және оның әріптестері де [92], белсенді түрлерді эндотелий клеткалардағы плазма индукцияланған пролиферация және апоптоз процестерінің маңызды мәні ретінде қарастырады. Қарастырылған плазманың төмен қарқындылықтағы клетка мембранасының өткізгіштілігі электрлік өрістің әсеріне жатқызылуы мүмкін [26, p. 212].

Сүтқоректілер клеткаларының ДНҚ молекулаларының зақымдануына ұшырауы эндогенді және экзогенді көздерден алынған ОБТ-нің нәтижесінде болатыны көрсетілді. MCF10A клеткаларды төмен температуралық плазмамен өңдегеннен кейін клеткаішілік ОБТ және N-ацетил цистеин H2AX фосфорландыруды толығымен оқшаулады, сөйтіп, ДНҚ молекуласы зақымдануының индукциясы жанама түрде клеткаішілік ОБТ түзілуі арқылы жүретіні зерттелді [11, p. 1].

Бактерияны тиімді жою үшін плазманың төменгі дозаларын қолданудың өзі жеткілікті, ал осындай мөлшер адамның және жануарлардың клеткаларына ешқандай зақым келтірмейді. Адамның немесе жануарлардың терісіне жасалған тәжірибелер осы теорияға сәйкес келеді. Қысқа уақытта өңдеу бактериялық

жүктемені едәуір төмендетеді, бірақ *in vivo* немесе *ex vivo* жағдайында макро- және микроскопиялық өзгерістерге ұшыратпайды. *FE-DBD* (*Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge*) құрылғысымен 10 минут өңдеуден кейін ғана адамның терісінде кератиноциттердің вакуолизациясы гистологиялық тұрғыда анықталды [34, p. 971].

Апоптоз процесін тудыру әсері қатерлі ісіктерді емдеуде қолданылуы мүмкіндігін *Fridman* және оның әріптестері FE-DBD плазмалық өңдеу құрылғысымен *in vitro* жағдайында ATCC A2058 меланома клеткаларында, ал *Lee* және оның әріптестері гелий плазмалы ине құрылғысымен G361 меланома клеткаларында көрсетті [106, 107]. Плазманың төмен мөлшері адамның тері меланомасының клеткалық линияларында апоптоз процесіне ұшырағаны байқалды, ал жоғары мөлшері клетка некрозының себебі болатыны анықталды [106, p. 171-172]. Сондай-ақ, колоректалды ісіктің клеткалық линиясын (HCT 116) қолдану арқылы қызықты зерттеу жүргізілді [108]. Бұл мақалада HCT 116 клеткалық линияларының апоптоздық жауабы *p53* генінің экспрессиясына тәуелсіз жүретіні көрсетілді. Сонымен, сүтқоректілер клеткаларын плазмалық өңдеуі бойынша жарияланған нәтижелерін қорытып қарастырсақ, әр түрлі дозадағы төмен температуралық плазма некроз не апоптоз процестеріне және клетканың ажырауына алып келуі мүмкін. Плазмамен индукцияланған клетканың ажырауы қайтымды процесс болғандықтан, плазмамен өңделген клеткалардың жойылуын, тасымалдануын және қайта жабысуын байқауға болады. Бұл хирургияда жаңа мүмкіндіктерге жол ашады, яғни осы кезде ұлпаның бір бөлігі аса нақтылықпен қоршаған ұлпаларды зақымдамай немесе қабынуды шақырмай жойылуы тиіс. Плазманың клеткалар пролиферациясын арттыратын немесе тежейтін қабілеті төмен температуралық плазманың жергілікті ангиогенезді реттеуде болашақта зор маңызы бар құрал екенін көрсетеді [92, p. 3581; 26, p. 212-213].

### 1.2 Митохондриялық биоэнергетика

Митохондриялар алғаш рет 1840 ж. сипатталды. Клеткалардың тыныс алу процестерін және цитохром *c* оксидазаны алғаш рет *Otto Warburg* 1930 ж. өз жұмыстарында сипаттаған болатын [109].

Клеткаішілік энергетикалық метаболизмде митохондриялар маңызды рөл атқарады. Митохондриялар клетканың тыныс алу процесіне қатысады. Сондай-ақ, клетканың басқа құрылымдары пайдалана алатын түрдегі энергия бөліп шығарады. Сондықтан, митохондрияны басқаша «клетканың энергиялық станция» деп те атайды [110]. Митохондриялар клеткада 4 негізгі қызметті атқарады: 1) клетканың көп бөлігін АҮФ түріндегі энергиямен қамтамасыз етеді; 2) оттегінің белсенді түрлерін түзеді; 3) цитозолдық кальций иондарын ($Ca^{2+}$) түзеді және реттейді; 4) митохондриялардың мебрана өткізгіштігі арқылы апоптоз процесін реттейді [111, 112].

Митохондрияларда өздерін қайта құруға және белок синтезіне қажетті жеке генетикалық жүйенің болуы, оларды басқа органеллалардан өзгешелендіреді. Митохондрияларда ядроның рибосомаларынан, ДНҚ және

РНҚ молекулаларынан өзгеше өз рибосомалары, ДНҚ және РНҚ молекулалары болады [110, б. 82]. Митохондриялардың сыртқы пішіні өзгермелі және көлемі тұрақты емес (майда дән, таяқша, сопақша жіп тәрізді). Клеткалардың көбінде олардың қалыңдығы тұрақты, шамамен - 0,5 мкм, ал ұзындығы тұрақсыз 7-10 мкм дейін жетеді. Ірі митохондриялар бұлшықет талшықтарының миосимпластары мен кардиомицеттерінде кездеседі [110, б. 83; 113]. Митохондриялардың саны клеткалардың түріне, атқаратын қызметіне және олардың энергия қажеттіліктеріне байланысты болады. Әртүрлі жануарлардың аталық жыныс клеткаларында митохондриялардың саны 20-70, ал ер адам жыныс клеткаларында 16 және ооциттерде 100000 дейін, сүтқоректілердің дене клеткаларында 500-1000, бауыр клеткаларында 2500-ге дейін жетеді [113, б. 36; 114]. Митохондриялар клетка цитоплазмасында біркелкі, ал патология жағдайларында, ядроның айналасына немесе цитоплазманың шет жағына қарай орналасады. Цитоплазмада гликоген сияқты клетка қосындылар шамадан тыс көп болғанда олар митохондрияларды клетканың шетіне қарай ығыстырады. Клетка бөлінгенде, яғни митоз процесі кезінде митохондриялар ұршық тәрізді жіпшелерге қарай шоғырланады да, олар бөлінген клеткаларға тең беріледі. Митохондриялар негізінен АҮФ қажет ететін құрылымдарда орналасады. Мәселен, митохондриялар миофибрилдерге, ал аталық жыныс клеткалардың талшығына қарай көп орналасады [113, б. 36].

Митохондрия қалыңдығы шамамен 6-7 нм болатын және гиалоплазмадан бөліп тұратын екі мембранамен (сыртқы және ішкі) қоршалып тұрады. Бұл екі мембрананың арасында ені 10-20 нм мембранаралық кеңістік болады. Сыртқы мембрана тегіс, ал ішкі мембрана тарақша тәрізді көптеген күрделі өсінділер - кристалар түзеді. Митохондрияның сыртқы мембранасы 20% белоктан құралса, ал ішкі мембранасы 75%-ға жуық болады. Бұл оны басқа клетка мембраналарынан ерекше екенін көрсетеді [110, б. 83; 113, б. 37].

Қорытындылай келе, клетканың энергия қажеттілігін қамтамасыз ету үшін АДФ молекуласынан АҮФ синтездеу митохондрияның негізгі функцияларының бірі болып табылады. Синтезделген энергия митохондриядан бөлініп, клетканың тіршілігіне жұмсалады. Нәтижесінде АҮФ қайта АДФ молекуласына айналады да митохондрияға енеді [110, б. 84, 112, б. 120-140].

### 1.2.1 Митохондрияларда жүретін энергетикалық процестер

Энергетикалық метаболизм – клеткадағы органикалық заттардың ыдырау реакцияларының жиынтығы. Оның негізінде қосылыстардың макроэргиялық байланыстарымен, яғни АҮФ молекуласының екі макроэргиялық фосфорлы-оттек байланыстарымен синтезі жүзеге асады. Клеткадағы энергиялық зат алмасу 3 кезеңнен тұрады: 1) дайындық; 2) анаэробты; 3) аэробты [115].

Аэробты (тыныс алу) сатысында пирожүзім қышқылы (ПЖҚ) мен карбон қышқылдарының $CO_2$ мен $H_2O$-ге дейін ыдырауы жүреді. Бұл сатыда АҮФ молекуласының үлкен мөлшері (36 АҮФ) синтезделеді және митохондрияның ішкі мембранасында жүреді [115, с. 50].

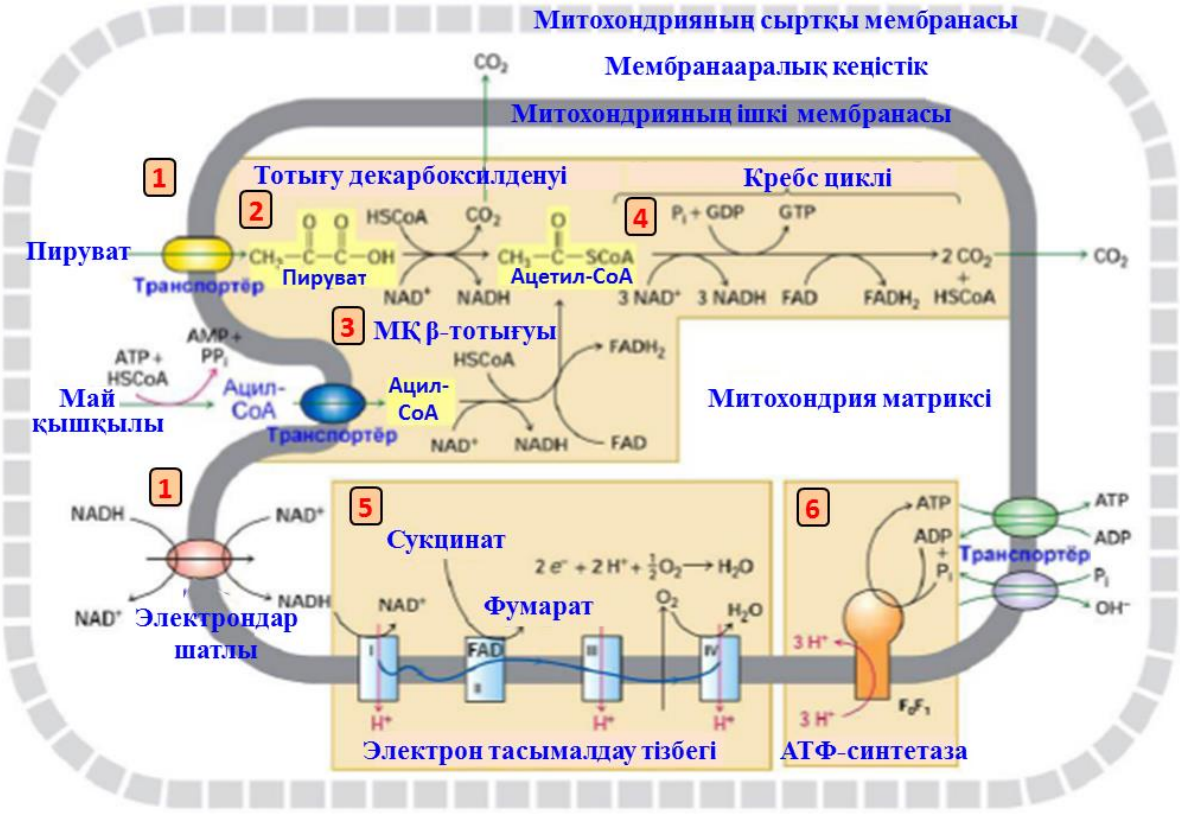
Тыныс алу сатысы келесідей бірнеше кезеңнен тұрады (2-сурет) [115, с. 50-53; 116]:

1. Митохондрияның ішкі мембранасының белгілі бір белок тасымалдау жүйелері пируват, май қышқылдары және никотинамидадениндинуклеотидтің тотықсызданған формасы (НАДН) молекулаларын гиалоплазмадан митохондрияның матриксіне тасымалдайды. Май қышқылдарын тасымалдау үшін алдымен кофермент А, ацетил-КоА кешендері синтезделеліп матрикске тасымалданады [116, с. 10].

2. Тотығу декарбоксилдену процесінде пируватдегидрогеназа ферментінің көмегімен пируваттың ацетил-КоА-ға айналуы жүреді. Бұл НАДН коферментінің тотықсыздануы мен $CO_2$ бөлінуі нәтижесінде жүзеге асады:

$$\text{ПЖҚ (С3)} \rightarrow \text{ацетил-КоА (КоА-S~CO-CH}_3\text{)} + \text{НАДН}^{\bullet}\text{H}^+ + CO_2 \qquad (14)$$

Ацетил-КоА – бір субстраттан екінші субстратқа ацетилдік топтарды таситын тасымалдаушысы болып табылады.




Сурет 2 – Митохондрияларда жүретін энергетикалық процестердің кезектілігі [116, с. 10]

3. Қатарлас түрде май қышқылдарының ацетил-КоА дейін β-тотығу процесі жүреді. Бұл НАДН пен флавинадениндинуклеотидтің тотықсызданған формасы ($ФАДН_2$) коферменттерінің тотықсыздануымен сипатталады.

4. Кребс циклінде ацетил-КоА $CO_2$ дейін тотығуы жүреді. Бұл да НАДН пен $ФАДН_2$ коферменттерінің тотықсыздануымен ұштасады. Бұл митохондрия матриксінде жүретін 7 ферментативтік реакциялардан тұрады. Мұнда декарбоксилдену, яғни $CO_2$ түрінде екі көміртек атомының жойылуы мен дегидрогенирациялануы, яғни сутегі атомының ыдырауы жүреді. Н атомдары $НАДН^+$- және ФАД-коферменттерімен акцептрленеді (НАД - никотинамидадениндинуклеотид, құрамында никотин қышқылы бар; ФАД - флавинадениндинуклеотид, В2 витаминінің туындысы) және 1 молекула АҮФ синтезделеді [116, с. 10-11].

Кребс циклінің реакцияларын жалпы алғанда келесідей сипаттауға болады [115, с. 50]:

$$CH_3CO\sim КоА + 2H_2O + 3НАД^+ + ФАД \rightarrow$$
$$\rightarrow КоА + 2CO_2 + 3НАДН^{\bullet}H^+ + ФАДН_2 + АҮФ \qquad (15)$$

$НАДН^{\bullet}H^+$ пен $ФАДН_2$ дегидрогеназа ферменттерінің кофакторлары және митохондрияның ішкі мембранасында орналасады. Сондай-ақ, молекулалық оттегіге электрондарды тасымалдауға қатысатын тыныс алу тізбегінің ферменттеріне электрондар мен протондарды таситын тасымалдаушысы қызметін орындайды [116, с. 10-11].

5. Тыныс алу процесі кезінде электрондар НАДН пен $ФАДН_2$ молекулалық оттегіге митохондрияның ішкі мембранасындағы электрон тасымалдау тізбегімен тасымалданады. Нәтижесінде протон қозғаушы күш қалыптасады [116, с. 10-11].

6. Протондық градиент митохондриялардың ішкі мембранасында АҮФ синтездеу үшін АҮФ-синтетаза ферментімен пайдаланылады [115, с. 50-53; 116, с. 10].

### 1.2.2 Тыныс алу тізбегі мен тотыға фосфорлану

Тыныс алу тізбегінің ферменттері электрон тасымалдау тізбегін (ЭТТ) түзеді. Сонымен қоса тотыға-тотықсыздану потенциалының өзгеру деңгейі арқылы тотықсыздану (электронды қосып алу) немесе тотығу (электронды беру) қабілеті бойынша белгілі бір жүйемен орналасқан 40-қа жуық әртүрлі белоктарды қамтиды [115, с. 51]. Тыныс алу тізбегінің компоненттерінің құрамына НАД- пен ФАД-тәуелді дегидрогеназа ферменттері, Q ко-фермент, цитохромдар, мысқұрамды және темір-күкіртті белоктар кіреді [115, с. 51; 117]. Электрон тасымалдау тізбегі мен тотыға фосфорлану ферменттерінің ішкі мембранадағы орналасу жүйесінің сызбанұсқасы 3-суретте көрсетілген.

Тыныс алу тізбегінің кешендері:

1) Тыныс алу кешендері ішінде кешен I ең ірісіне (НАДН-убихинон-оксидоредуктаза, НАДН-КоQ-редуктаза немесе НАДН дегидрогеназа) жатады, оның салмағы 800 кДа асады. Сондай-ақ 42-ден астам әртүрлі полипептидтік тізбектерден тұрады. Оның ішінде ФМН-құрамды флавопротеин мен кем дегенде алты темір-күкіртті орталықтары бар [118, 119]. Кешен I құрылымы L-

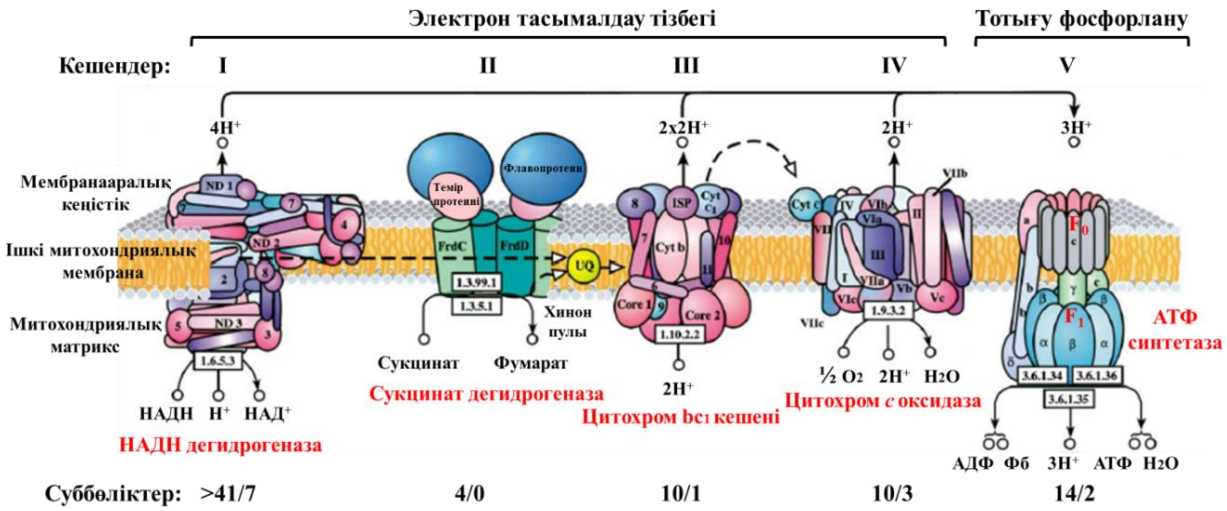
пішінді екі «қолдан» тұрады: оның біріншісі ішкі митохондриялық мембрананың липидті қабатында орналасқан «ұзын қолды» гидрофобты мембраналық белоктан тұрса, ал екіншісі матрикске шығып тұратын, сондай-ақ құрамында ФМН мен НАДН байланыстыратын белсенді орталығы бар «қысқа қолды» гидрофилді бөлігінен тұрады [120, 121]. Кешен I бір уақытта келесідей екі байланысқан процестерді іске асырады:

1) матрикстегі НАДН пен протоннан гидрид-ионды убихинонға экзоргоникалық берілуі,

$$НАДН + H^+ + Q \rightarrow НАД^+ + QH_2 \qquad (16)$$

2) матрикстен мембранааралық кеңістікке 4 протонның эндергоникалық берілуі.

Осыған орай, кешен I электрон тасымалдау энергиясына байланысты протондық сорғы қызметін атқарады. Сондай-ақ катализдейтін реакция векторлы болып табылады, сонымен қатар протондарды бір орыннан (матрикс, протондар кетуіне байланысты ол теріс зарядталған болады) келесі бір орынға (мембранааралық кеңістік, оң зарядталғанға айналады) белгілі бір бағытта жылжыта алады [118, p. 697]. Кешен I НАД-Н тотықтырып, яғни одан 2 электронды өзіне тартып алады да, липидтерде еритін убихинонға тасымалдайды, келесі ретте убихинон мембрана ішінде кешен III-ке өтеді. Убихинон тыныс алу тізбегіндегі электрондардың маңызды тасымалдағышы болып табылады [120, с. 7].




Сурет 3 – Сүтқоректілердің электрон тасымалдау тізбегінің және тотығу фосфорлануының сызбанұсқасы [117, p. 129]

2) Кешен II (сукцинатдегидрогеназа; сукцинат-убихинон оксидоредуктаза) – митохондриялық тыныс алу тізбегінің фрагменті ретінде қызмет атқаратын Кребс циклінің мембранамен байланысқан компоненті болып саналады. Кешен II-нің молекулалық массасы 125-140 кДа тең интегралдық белок. Оның

құрамында ковалентті байланысқан ФАД пен темір-күкіртті орталықтары болады. Бұл орталықтар мембраның сыртқы доменінде орналасқан және олар сукцинаттан убихинон мен цитохром b геміне (гидрофобты мембраналық доменінде орналасқан) электрон тасымалдануын катализдейді [120]. Кешен II төрт түрлі протеинді суббірліктерден тұрады. Оның ішінде C және D суббірліктерінің әрқайсысы үш трансмембраналық шиыршығы бар интегралды мембраналық белоктар болып саналады. Сондай-ақ олар гем тобы (гем b) мен убихинон байланысатын сайтын қамтиды. Ал, А және В суббірліктері матрикс жағына қараған жерінде орналасады. Олардың құрамында үш 2Fe-2S орталықтары байланысқан ФАД және сукцинат субстратымен байланысатын сайты болады. Электрондардың сукцинат-байланыстырушы сайтынан ФАД-қа, содан кейін Fe-S орталықтары арқылы Q - байланыстырушы сайтына тасымалдану жолы жүреді. Осы барлық реакциялардан кейін кешен III қызметі басталады [118, p. 698-700].

Сонымен, кешен II протондарды өзінен шығармайды, бірақ сукцинаттың тотығу салдарынан қосымша электрондардың тізбекпен байланысын қамтамасыз етеді.

3) Кешен III (цитохром $bc_1$ кешені немесе убихинон-цитохром с оксидоредуктаза) 10-11 полипептидтік тізбектерден тұрады. Олардың үшеуі тотығу-тотықсыздану реакцияларына қатысады. Сондай-ақ кешен III-тің екі бөлек домендерімен убисемихинонның екі молекуласы байланысады. [120, с. 7]. Кешен III-тің молекулалық салмағы 400-500 кДа құрайды. Әр мономер цитохромдармен байланысқан үш гемнен және темір-күкіртті белоктан тұрады. Кешен III электрондарды убихиноннан қабылдап, цитохром *c*-ға береді, ал цитохром *c* өз кезегінде оларды цитохромоксидаза кешеніне, яғни кешен IV-тің $Cu_A$ орталығына тасымалдайды [119, с. 452]. Убихинон екі электронды тасымалдайды, ал цитохромдар бір циклде электрондарды жеке бір-бірден жеткізеді. Цитохром *c* ішкі мембрананың мембранааралық кеңістік бетінде орналасқан перифериялық белогы болып табылады және ол тұзды ортада оңай еритін қабілетке ие [120, с. 7].

KoQ-дан кешен III жылжитын екі сутегі атомдарынан әрі қарай тізбек бойымен тек электрондар ғана тасымалданады. Екі протондар ($H^+$) кешен III мембранааралық кеңістікте шығарылады. Сонымен бірге, матрикстен кешенмен ұсталынатын тағы бір жұп протондар да мембранааралық кеңістікте өтеді. Сөйтіп, кешен III жалпы мембранааралық кеңістікте төрт протондарды шығарады. Сол себепті, кешен I-мен қатар кешен III те протондық генератордың рөлін атқарады. Кешен III тотығу-тотықсыздану тізбегінің ең баяу жүретін құрамдас бөлігі болып саналады. Оның жұмыс істеуінің ең көп жылдамдығы 10 мс аспайды [122].

4) Кешен IV (цитохром с оксидаза; цитохромоксида; цитохром с-$O_2$ оксидоредуктаза) – митохондрияның тыныс алу тізбегінің соңғы катализаторы болып табылады. Кешен IV цитохром *c*-ның төрт молекуласынан төрт электрондардың $O_2$-ге берілуін катализдейді. Сондай-ақ мембранааралық кеңістікке екі протонды тасымалдайды және қалған екі протонды судың

түзілуіне жұмсайды [120, с. 7-8]. Кешен IV митохондрияның ішкі мембранасының үлкен ферменттерінің бірі болып саналады, 13 суббірліктен тұрады және оның молекулалық салмағы 204 кДа құрайды. Бұл кешен цитохром *а* және *а3* тұрады. Ал оларың құрамында гемнен басқа мыс иондары болады. Суббірлік I *а* және $a_3$ ретінде белгіленетін екі топ гемнен және тағы бір мыс иондарынан ($Cu_B$) құралады. Суббірлік II екі ядролық орталығында ($Cu_A$) Cys екі қалдықтарының SH-топтарымен біріккен екі мыс иондарын (Cu) қамтиды. Гем $a_3$ пен $Cu_B$ гем *а* электрондарды қабылдайтын және оларды гем $a_3$ байланысқан $O_2$ тасымалдайтын екінші екі ядролы орталығын қалыптастырады. Электрон кешен IV арқылы цитохром *с* $Cu_A$ орталығына, гем а, $Cu_B$ орталығының гем $a_3$, және ең соңында $O_2$ тасымалданады [118, p. 700-703].

Цитохромдар, мыс атомдары мен темір-күкіртті орталықтар бір уақытта тек бір электронды ғана тасымалдайды. НАДН-тың әрбір молекуласы екі электронды береді және $O_2$-нің әрбір молекуласы су молекуласын түзу кезінде төрт электронды қабылдайды [119, с. 451].

5) Кешен V (АУФ-синтетаза, АУФ-синтаза) - 500 кДа-нан артық молекулалық салмағы бар митохондрияның ішкі мембранасында орналасқан интегралдық белок болып табылады. Электрон тасымалдау энергиясы негізінде мембранааралық кеңістікке шығарылған протондар митохондриялық матрикске қайта өтеді. Бұл процесс $H^+$-тәуелді АУФ-синтетаза ферменті көмегімен іске асырылады. Бұл ферменттің екі негізгі компоненті бар: ішкі митохондриялық мембрананың матрикске қараған бөлігінде орналасқан суда еритін каталитикалық бөлігінен (F1), сондай-ақ мембрананың ішкі бетімен жанасқан протондық каналдан тұрады. Протондар қозғалған кезде $F_1$-фрагменті белсенді бола бастайды. Бұл $F_1$-фрагменті АДФ пен бейорганикалық фосфаттан АУФ синтезінің реакциясын катализдейді. Энергияның 40% АУФ синтезі үшін пайдаланылса, ал 60% жылу ретінде босап шығады [120, с. 7-9; 123-125]. Суда еритін $F_1$ белогын мембранамен байланыстырып тұруда электростатикалық өзара әрекеттесулер маңызды рөл атқарады. $F_o$ қарағанда $F_1$ түйісу факторын салыстырмалы түрде мембраналық фрагменттінен жеңіл бөліп алуға болады. $F_1$ жою электрондық тасымалдау тізбегі бойынша электронның тасымалдануына кедергі келтірмейді, бірақ энергияны түзетін органеллалардың мембраналары бұл жағдайда толымсыз болады. Яғни электрондық тасымалдау АУФ синтезіне әкелмейді. Ал, мембранада қалған $F_o$ фрагменттері өз бетімен АУФ синтездеуге де, не оны гидролиздеуге де қабілетті емес күйде болады. [123, с. 10-17].

$H^+$-АУФ-синтетаза кешенінің $F_o$ мембраналық фрагменті арнайы протондық канал қызметін атқарады. Мұнда осы канал арқылы сутегі иондары $F_1$ түседі. Фосфорлану субстраттары, яғни АДФ пен Фб болмаған кезде $F_oF_1$-кешендері арқылы протондардың ағылып кетуі салыстырмалы шағын ғана болады. $F_1$ әрекетсіз күйдегі фрагменті протондар жолын тосқауылдайды. $F_1$ болмаған жағдайда $F_o$ протон өткізгіш каналы арқылы еркін өтуге мүмкіндік болар еді. Мембранадан суда еритін $F_1$ белогын бөліп алған кезде, түйісетін мембрана сутегі иондары үшін өткізгіш түріне айналады. Келесі ретте $F_o$ мембраналық фрагментімен түзілетін протондық каналмен түйісетін

мембрананың екі жағында сутегі иондарының концентрациясы теңеседі (3-сурет) [123, с. 10-17].

Сонымен, 3-суретте көрсетілгендей, электрондар НАДН немесе сукцинаттан, тиісінше I немесе II кешенге ағады да, содан соң убихинон пулына түседі (сары түсті). Содан кейін, электрондар убихиноннан III және IV кешендері арқылы соңғы акцепторы молекулалық оттегіге өтеді. Электрон ағыны ішкі мембранадағы кешен I, III және IV арқылы протондар қозғалысымен жалғасады. Нәтижесінде алынған протондық градиент АҮФ өндіру үшін кешен V қатысуымен жиналады. Митохондриялық немесе ядролық геномдармен кодталатын суббірліктер саны 3-суреттің төменгі жағында көрсетілген [117, p. 128-130].

*Тотыға фосфорлану.* Тотыға фосфорлану - митохондрияның ішкі мембранасында жүретін іргелі метаболиттік реакциялардың бірі және митохондрияда тыныс алу тізбегі бойымен электрондардың қозғалуы кезінде АДФ пен Фб-тен АҮФ түзілу процессі жүреді [120, с. 10; 126].

Тыныс алу тізбегінің немесе тотыға фосфорлану жұмыс істеу процессінде босаған энергияны сақтау механизмі қазірге дейін әлі толық анықталмағаны әдебиеттерде жазылған. Тотыға фосфорлану процесінің үш негізгі гипотезасы бар: 1) химиялық түйісу гипотезасы; 2) тотыға фосфорланудың конформациялық теориясы; 3) хемиоосмостық түйісу гипотезасы. Аталған гипотезалардың ішінде 1961 жылы *P. Mitchell* ұсынған хемиоосмостық гипотезасы ерекше маңызды орын алады. Өткен ғасырдың 70-жылдары *P. Mitchell* осы жаңалығы үшін биохимия саласы бойынша Нобель сыйлығына ие болды [127].

Хемиоосмостық гипотеза басты үш постулаттарға негізделген:

1. Тотыға фосфорлану ішкі митохондриялық мембранамен шектелген жабық кеңістікте жүреді.

2. Ішкі митохондриялық мембрана протондар үшін өткізгіш емес болып табылады.

3. Ішкі митохондриялық мембранада протондардың тасымалдануын қамтамасыз ететін протондық соғырлардың болуы.

Қазіргі таңда, бірнеше протондық соғырлар бар екені анықталған. Олардың біріне митохондриялық тыныс алу тізбегі жатады деп қарастырылады. Тыныс алу тізбегі бойымен электронның тасымалдану процессі кезінде бөлінетін энергия бастапқыда ішкі митохондриялық мембрана арқылы матрикстен мембранааралық кеңістікке протондарды шығарып тастау үшін жұмсалады [127, с. 213; 128-131]. Митохондриялардың басқа протондық сорғы ретінде $H^+$-АҮФ-аза ферментін айтуға болады. Ішкі митохондриялық мембранаға орныққан бұл фермент, АҮФ гидролизі реакциясын жүзеге асырады. Осы реакция барысында босап шыққан энергия, ішкі митохондриалық мембрана арқылы протондарды тасымалдау үшін қолдаланылады [127, с. 213].

Субстрат тыныс алу тізбегіне $2H^+$ мен $2e^-$ береді. Тыныс алу тізбегі бойымен $2e^-$ қозғалуы нәтижесінде матрикстен мембранааралық кеңістікке 8 - 10 протондар ($H^+$) тасымалданады, яғни мембранааралық кеңістікте

протондардың ($H^+$) электрохимиялық градиентінің генерациясы – $\Delta\mu H^+$ түзіледі. Митохондриялардың матриксінде эндогенді судың диссоциация процесі жүреді [120, с. 8]:

$$H_2O \rightarrow H^+ + OH^- \quad (17)$$

Тыныс алу тізбегі бойымен екі электрондардың қозғалысы кезінде осы протондар ($H^+$) мембранааралық кеңістік бағытына өтеді. Нәтижесінде, мембранааралық кеңістіктің беткі жағына қаратылған ішкі мембрананың сыртқы беті оң (+) зарядталса, ал ішкі беті теріс (-) зарядталады. Сонымен, электрохимиялық потенциал түзіледі, яғни ол матрикске протондық АҮФ-аза ($H^+$-АҮФ-синтаза) арқылы протондардың өтуіне әкеледі [120, с. 8; 126, с. 758]. Тыныс алу кешендері арқылы өтетін электрондардың тотығу-тотықсыздану потенциалы төмендеуінің химиялық бос энергиясы $H^+$ электрохимиялық градиентін, яғни $\Delta\mu H^+$ потенциалын құру үшін пайдаланылады, ол протон-қозғаушы күші – $\Delta p$ ретінде электрлік потенциал бірлігімен белгіленіп, төмендегі теңдеу бойынша есептеледі:

$$\Delta p \text{ (мВ)} = \Delta\psi_m - (2{,}3\ RT/F)\ \Delta pH, \quad (18)$$

мұндағы: $\Delta\psi_m$ – ішкі митохондриялық мембрананың трансмембраналық электрохимиялық потенциалы, $\Delta pH$ – ішкі мембранадағы pH градиенті; R, T, және F - тиісінше тұрақты абсолютті газ температурасы сонымен қатар Фарадей тұрақтысы. 37˚С температурада $\Delta p = \Delta\psi m - 60\Delta pH$. $\Delta p$ құру кезінде негізгі үлесін көп жағдайда мөлшері шамамен 150-180 мВ болатын $\Delta\psi_m$ құрайды, $\Delta p$ 200-220 мВ тең болады. $\Delta p$ – АДФ фосфорлану процесінің және бақыланатын метаболиттік жағдайларындағы (АДФ болмаған жағдайда) электрондар ағыны тежелуінің қозғаушы күші болып саналады. $\Delta\mu_H$ протондық потенциалы төмендегідей екі компоненттерден тұрады: электрлік ($\Delta\psi_m$) және химиялық (осмостық, $\Delta pH$) [120, с. 8]. Протондық электрохимиялық потенциал митохондриялардағы энергияны сақтаудың бастапқы түрі болып табылады. Кейін бұл энергия төменде көрсетілген мақсаттар үшін қолданылуы мүмкін:

- АҮФ синтезі немесе тотыға фосфорлану процесі;
- жылы қанды жануарларда жылу түзу (термогенез);
- механикалық қызметі;
- митохондрияның ішкі мембранасы арқылы электрленген молекулалардың бағытталған тасымалдауына пайдаланылуы мүмкін.

Мұнда клеткадағы әмбебап энергия көзі ретіндегі АҮФ синтезі маңызды рөл атқарады [127, с. 213-215].

*АДФ фосфорлануында электрохимиялық потенциалдың және $F_1$-АҮФ-азалық молекулалық ротордың рөлі.* Тотыға фосфорлану процесі ішкі митохондриялық мембрананың тұтастығы бұзылмаған жағдайда ғана жүруі мүмкін [120, с. 9; 123, с. 8-16; 125]. Ішкі митохондриялық мембранадағы кез келген үзілістер мен ойықтар оның тотыға фосфорлануын қабілетсіз етеді, бірақ

дегенмен, бұл жағдайда электрондардың субстраттан оттегіге тасымалдануы жалғаса беруі мүмкін [125, с. 386]. Процестің бірінші бөлігі НАДН химиялық потенциалы мен янтарь қышқылының (сукцинат) тотығу энергиясының $H^+$ электрохимиялық градиентке түрлендірілуімен жүзеге асады, ал процестің екінші бөлігі протондық градиенттің энергиясын қолдану есебінен АҮФ-синтазамен катализденетін АҮФ эндэргоникалық синтезделу мәнісіне байланысты болады. Бұл процесс термодинамикалық тұрғыда болуы мүмкін, өйткені ЭТТ бойымен электрондардың тасымалдануы кезінде бөлінетін энергия және протондық қозғаушы күші ~ 32 кДж талап ететін АҮФ бір молекуласын қайта синтездеуге әкелу үшін жеткілікті бос энергияны сақтауына байланысты болады [120, с. 9].

Тотыға фосфорлану, сондай-ақ мембрананың өткізбейтін қасиетіне де байланысты болуы мүмкін. Мембрана зақымдалған жағдайда немесе егер ол қандай да бір әсерлер нәтижесінде кенеттен $H^+$, $OH^-$, $K^+$, $Cl^-$ үшін немесе басқа кейбір иондар үшін оңай өтімді болса, онда бұл кезде тотыға фосфорлану процесі жүрмей қалады. Жоғарыда аталған байқаулар ішкі митохондриялық мембрананың екі бетінің арасындағы иондық құрамындағы немесе концентрациясындағы айырмашылық АҮФ синтезінде маңызды рөл атқаратынын көрсетті [125, с. 427-429].

*Электрон тасымалдау тізбегінің және тотыға фосфорланудың ингибиторлары.* Электронды тасымалдау механизмдері негізінен арнайы ингибиторлардың әсерін зерттеу арқылы анықталды, ал содан кейін ол тотыға-тотықсыздану құрамдастарының стандартты тотықсыздану потенциалдарын өлшеумен дәлелденді [132, 133, p. 604]. Электрон тасымалдау ингибиторлары – тыныс алу тізбегінің құрамдастарымен өзара байланыс орнататын және сол арқылы олардың қызметін бұзатын заттар болып табылады. Олар клеткалық токсиндер және ұлпалық гипоксияны туғызады. Митохондриялардың суспензиясымен тұтынылатын $O_2$ жылдамдығы электрон тасымалдау тізбегі қызметінің сезімтал өлшеуіші болып саналады [133, p. 604-616].

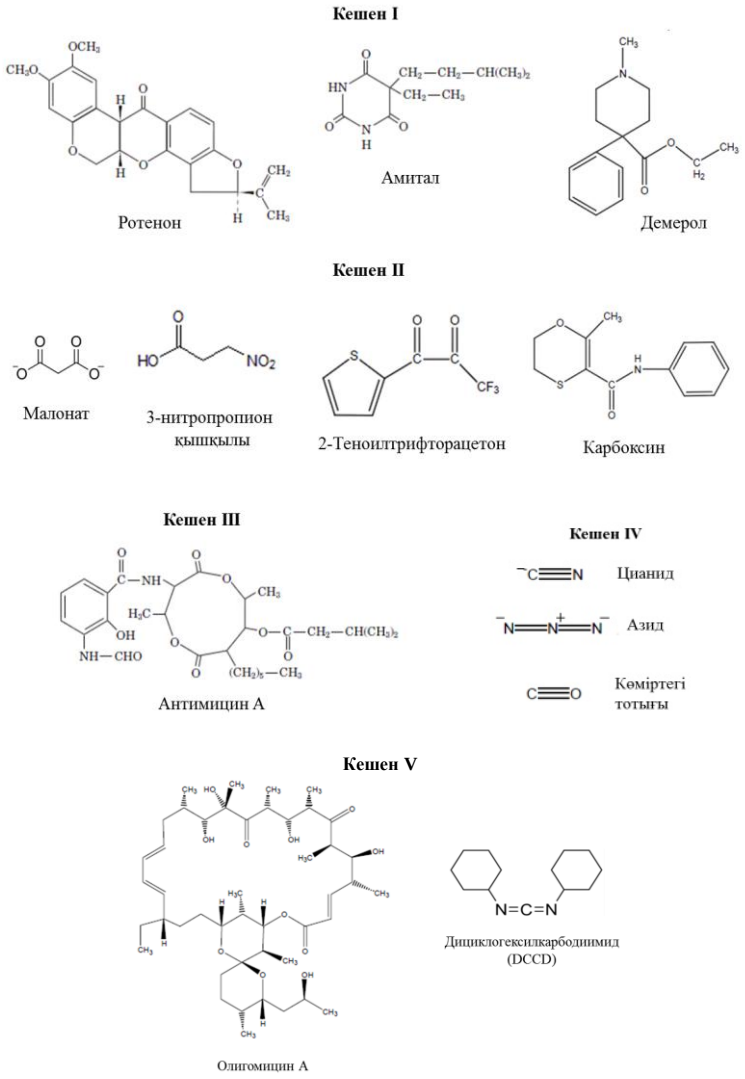
Электрондар тасымалдауының белгілі бір кезеңдерін тежейтін қосылыстарға (олардың $O_2$ тұтыну әсерлеріне байланысты) төмендегілер жатады: ротенон, пиерицидин, амитал (барбитурат), дифенилен иодоний, теноилтрифторацетон, малонат, оксалоацетат, антимицин А, цианид, азид және т.б [133, p. 604-616]. Электрон тасымалдау тізбегінің кейбір ингибиторларының құрылымдары 4-суретте келтірілген. Сонымен қатар осы агенттермен тежелу сайттары 5-суретте көрсетілген.

Кешен I белсенділігі ротенонмен [118, p. 698; 132-134], пиерицидинмен, амиталмен [118, p. 698; 132, 136] және дифенилен иодониймен (DPI) [135] тежеледі. Ротенон қосылысы кешен I (НАДН-КоQ-редуктаза) электрон тасымалдауын қатты тежейтін кең тараған инсектициді болып табылады. Ротенон кейбір өсімдік түрлерінің тамырларынан өндіріледі. Оны амазондық үндістер балық уы ретінде пайдаланған [125, 132-134]. Ротенонның 65% тежелу үшін 1г митохондриялық белокқа 33 нМ ротенон жеткілікті [136]. Амитал барбитурат жоғары концентрацияда НАДН-гидрогеназаны тежейді.

Пиерицидин А – *Streptomyces* туысының бактерияларымен синтезделетін антибиотик. Пиерицидин убихинонның құрылымдық аналогы болып саналады, сондықтан электрондарды тасымалдау үшін олармен бәсекелеседі. Оны 50% тежеу үшін 1г митохондриялық белокқа 20 нМ концентрациясы қажет. Сондай-ақ, әдетте кеңінен қолданылатын ауру басатын демедрол да, НАДН-дегидрогеназы тежейді. Сонымен қатар, қосылыстардың барлығы НАДН-КоQ-редуктазаның Q коферментінің төмендеуін және Fe-S кластерлердің тотығуын тежейтін қасиеті бар [118, p. 698; 132, p. 698-700; 136]. DPI митохондриялық кешен I (НАДН-убихинон-оксидоредуктазаны) тежейтіні және мұның нәтижесінде тотыға фосфорланудың төмендеуіне әкеп соғатыны жайлы жарияланғаны белгілі [135, p. 607]. *Majander* және оның әріптестері [137], әрі қарай DPI кешен I темір-күкіртті кластерлерін ФМН қайтымсыз реакциясы арқылы төмендеуіне кедергі келтіруі мүмкін екендігін дәлелдеді. DPI тежелу нәтижесінде, митохондриялық ОБТ өндірісі тежелетіні анықталған [138].

Кешен II электрондардың тасымалдану процесі теноилтрифторацетонмен, малонатпен, оксалоацетатпен [134, p. 33], сонымен қатар 3-нитропропиондық қышқылмен [139, 140] және карбоксинмен [141, 142] тежеледі. Малонат сукцинатдегидрогеназа ферментінің бәсекелестік ингибиторы болып табылады: малонат ферментінің белсенді сайтымен әсер тигізбей байланысады және сондықтан сукцинатпен, яғни ферменттің кәдімгі субстратымен тең түседі. Малонат сукцинатдегидрогеназа кешенінің бәсекелестік ингибиторы болып табылатындығы жайлы бақылаулар, осы ферментінің белсенді сайтының құрылымын шығару үшін қолданылған болатын [143]. 3-нитропропион қышқылы, митохондриялық тыныс алуының кешен II ингибиторы болып саналады және ферменттің белсенді орталығында аргининнің каталитикалық негізімен ковалентті аддукт түзеді [139, p. 5969].

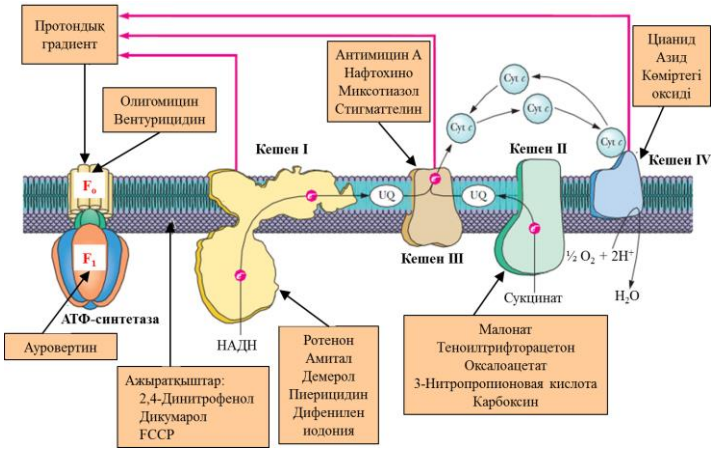
Кешен III антимицинмен, нафтохинонмен, миксотиазолмен, стигматтелинмен және гипогликемиялық агенттермен тежелетіні мәлім [118, p. 698; 132, 136, 144, 145]. Антимицин А *Streptomyces Kitazawensis* өндірілетін химиялық қосылыс (антибиотик) болып табылады [146]. Антимицин А цитохром *b* және *c* арасындағы митохондриялық электрондар тасымалдауын тоқтататын электрон тасымалдау тізбегіндегі убихинолдың тотығуын тежеу үшін митохондриялық кешен III цитохром *c* редуктазаның Qi сайтымен байланысатыны мәлім [118, p. 698; 147-149]. Электрон тасымалдануының тежелуі ішкі митохондриялық мембрана арқылы протондық градиенттің ыдырауын тудырады, ал бұл митохондриялық мембрана потенциалының ($\Delta\Psi m$) жоғалуына әкеліп соғады [147, 149, 150]. Кешен III тежелу салдарының нәтижесіне ОБТ өндірілуінің арттырылуы [118, p. 699; 144, 150, 151] мен клеткалық АҮФ деңгейінің төмендеуі жатады [147-149]. Тежелу процесі төмен концентрацияларда, демек 1 моль ингибитордың 1 моль ферментімен байланысу жағдайында жүреді [136, с. 9].




Сурет 4 – Электрон тасымалдау тізбегі (кешен I, II, III және IV) мен АУФ-синтетаза (кешен V) ингибиторларының құрылымдары [132, p. 698]

Кешен IV цианид, азид және көміртек тотығымен (CO) тежеледі, әрі осы үш жағдайда ингибиторлар цитохром $a_3$ өзара байланысады. Цианид ($CN^-$ иондары) және азид – $a_3$ феррицитохромдар $Fe^{3+}$-мен координациялық (үйлестірулік) кешенін қалыптастырады және цитохромоксидазаның $Fe^{2+}$ дейін тотықсызданууын бәсеңдетеді. CO цитохромоксидазаны тежеп, нәтижесінде геммен ($Fe^{2+}$) байланысу арқылы оның оттегімен өзара байланысуын тоқтатады. Осы сайтта цианид пен азидтің тежеуіші әсері өте қарқынды болып табылады, ал CO-ның негізгі улылығы оның гемоглобиндегі темірге ұқсастығынан пайда болады. Бұл цианид пен көміртегі тотығының улы әсерлері арасындағы аса маңызды айырмашылық. Жануарларда (адамдарды қоса алғанда) гемоглобин молекулалары өте көп тасымалданатындықтан олар оттегіге бай ауамен көп мөлшерде тыныс алуы тиіс, себебі көміртегі тотығы мөлшерден тыс артқан жағдайда оларды өлімге душар етеді. Алайда, бұл организмдерде цитохром $a_3$ молекулалары салыстырмалы түрде өте аз болып келеді. Демек, цианидтің шектеулі әсері өлім қауіпіне әкелуі мүмкін [132, p.

699; 136, с. 10; 145, 152, 153]. Азидтің, цианидтің және CO әсері кезінде 50% тежелу, тиісінше 0,7; 0,5; 40 мМ концентрациялары болғанда жүзеге асады [136, с. 9] .



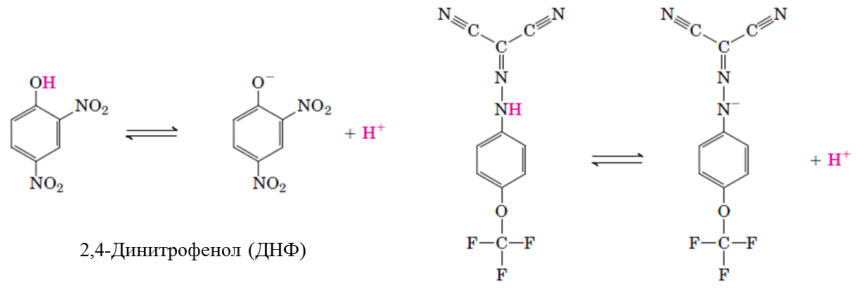

Сурет 5 – Электронд тасымалдау мен тотыға фосфорланудың бірнеше ингибиторларының әсер ету сайттары [132, p. 699]

Кешен V (АҮФ-синтетаза) олигомицинмен ($F_o$ және $CF_o$ тежейді), вентурицидинмен ($F_o$ және $CF_o$ тежейді), ауровертинмен ($F_1$ тежейді) және дициклогексилкарбодиимидпен ($F_o$ және $CF_o$ арқылы протондық ағынын тежейді) тежеледі [118, p. 705]. 4-суретте АҮФ-синтетазаның кейбір ингибиторларының құрылымдары келтірілген. Олигомицин, сондай-ақ $F_o$ арқылы протондар қозғалысы тежеледі [132, p. 698]. АҮФ синтезінің олигомицин А тежелуі электрон тасымалдау тізбегі арқылы электрондар ағынын азайтады. Дегенмен, электрондардың ағыны протондық ағылу немесе митохондриялық ажыратылу процестері салдарынан толық тоқталмайды. Ауровертин – химиялық құрылымы бойынша полиендік пирондарға жататын антибиотиктер тобы. Митохондриялардағы тотыға фосфорлану $F_1$ фракциясының күшті ингибиторы [154, 155]. N, N-дициклогексилкарбодимид (DCCD) $F_oF_1$-АҮФ-синтазаның ($F_oF_1$) классикалық ингибиторы болып табылады. $F_o$ фракциясында протеолипидтік суббірліктің (*c* суббірлігінің) жоғары консервативтік карбон қышқылымен ковалентті байланысу салдарынан канал арқылы протондар ағынын тежейді [156, 157].

*Тотыға фосфорланудың ажыратқыш заттектері.* $F_1$ факторы кеңістігінің өзгеруі және соның нәтижесінде АҮФ-пен оның кешенінің мүмкін болатын диссоциациялануы ішкі митохондриялық мембранада протондық градиенттер жеткілікті мөлшерде болғанда ғана жүзеге асады. Протондық градиент көлемінің төмендеуі тыныс алу тізбегі бойымен электрондарды тасымалдаумен түйісуі АҮФ синтезін болдырмайды, нәтижесінде тыныс алу және тотыға фосфорлану процестерінің босап шығуына әкеледі. Мұндай әсерді тудыратын заттар тотыға фосфорланудың ажыратқыштары деп аталады [127, с. 217-218].

Тотыға фосфорланудың барлық ажыратқыштары ішкі митохондриялық мембрана арқылы протондарды тасымалдаушылар (протонофорлар) ретінде қызмет атқарады, осылайша, олар протондық градиентті зақымдай алады. Бұл ажыратқыштар молекуласының митохондриялардан тыс протондар есебінен кері протондалуына байланысты болады және мұндай түрде мембрананың матрикстік бетіне оның гидрофобты қабаты арқылы электрофоездік түрде қозғалуы жүреді. Митохондриялық мембрананың ішкі бетінде ажыратқыштардың депротонданууы орын алады. Бұл кезде босап шыққан протон матрикске өтеді. Бұл жағдайда, яғни ішкі митохондриялық мембранаға ажыратқыштар түскен кезде, митохондриялардан босап шыққан протондар градиент концентрациясы бойынша $F_o$ протондық канал арқылы емес, керісінше тікелей мембрананың кез келген бөлігі арқылы матрикске қайта кері оралу қабілетіне ие болады. Мұндай тасымалдау протондық градиент көлемінің төмендеуін анықтайды. Осының нәтижесінде, протондық токтың энергиясы белоктардың каталитикалық бөлігінің $F_1$ түйісу факторында кеңістіктердің қайта құрылуларының туындауы үшін жеткіліксіз болады [127, с. 215-217].

Табиғи ажыратқыштарға адреналин мен тироксин гормондары, май қышқылдары және т.б. жатады [127, с. 217-218; 158]. Ал химиялық ажыратқыштардың үлгі мысалдарына 2,4-динитрофенолды, дикумаролды және карбонилцианид-р-трифтор-метоксифенилгидразонды (фтор карбонилцианид фенилгидразон немесе FCCP деп те аталады) жатқызуға болады (6-сурет). Бұл қосылыстардың екі ортақ белгілері бар: гидрофобты табиғаты және протонды диссоциациялауы [132, p. 700].




2,4-Динитрофенол (ДНФ)

Карбонилцианид-р-трифтор-метоксифенилгидразон (FCCP)

Сурет 6 – Тотыға фосфорланудың химиялық ажыратқыштары [132, p. 700]

Бұл химиялық заттар, АДФ АҮФ дейін фосфорлануын тежейді, бірақ митохондриялардағы электрондар тасымалдауына ешқандай кері әсер етпейді. Олар электрондарды тасымалдау мен АҮФ синтезін ажыратады, яғни осы процестер арасындағы қажетті байланысты жояды. Олардың қатысуы нәтижесінде электрондарды тасымалдау кезінде бөлінетін бос энергия жылуға айналады, яғни АҮФ түрінде сақталмайды. Ажыратқыш агенттер $H^+$ иондары үшін ішкі митохондриялық мембраналардың өткізгіштігін күрт арттырады. Бұл липофильді заттар, олар мембрананың бір жағында $H^+$ иондарын байланыстыратын және оларды мембрана арқылы екінші жағында, яғни

олардың концентрациясы төмен жағына тасымалдайтын қабілеті бар [125, с. 415-417]. Егер де клеткаларға осы төмен органикалық қосылыстарды қосса митохондриялар АҮФ синтезін тоқтатады, дегенмен оттегі сіңіруін жалғастыра береді. Ажыратқыш агенттердің қатысу салдарынан электрондар тасымалдауының жылдамдығы жоғары болып қала береді, бірақ протондық градиент құрылмайды [158]. Сонымен, ажыратқыштар тыныс алу тізбегі бойымен электрондардың тасымалдауына елеулі әсер тигізбейді, бірақ тотыға фосфорлану процесінде АҮФ синтезін тежейді [127, с. 218].

Кейбір ионофорлардың да тотыға фосфорлануды тежей алатын қабілеті. Ионофорлар (яғни «иондарды тасымалдаушылар») деп, белгілі бір иондарды байланыстыруға және оларды мембрана арқылы тасымалдауға қабілетті майда еритін заттарды айтады. Олар ажыратқыш агенттерден мембрана арқылы $H^+$ иондарын емес, қандай да болмасын басқа катиондарды тасымалдайтындығымен ерекшеленеді. Мысалы, токсинді антибиотик валиномицин митохондрияның ішкі мембранасы арқылы оңай өтетін $K^+$ иондарымен майда еритін кешенді құрайды, ал валиномицин болмаған жағдайда $K^+$ иондары осы мембрана арқылы енуі өте қиындай түседі. Грамицидин ионофоры мембрана арқылы $K^+$ иондарының енуін ғана емес, сонымен бірге $Na^+$ және басқа да бір валентті катиондардың енуін де жеңілдетеді. Сонымен, ажыратқыш агенттер мен ионофорлар $H^+$, $K^+$ немесе $Na^+$ иондары үшін мембрананың өткізгіштігін арттырып, тотыға фосфорлануды басады [125, с. 421-423].

### 1.2.3 Митохондрияларда оттегінің және азоттың белсенді түрлерінің түзілуі

Митохондриялар эндогендік клеткалық ОБТ көп мөлшерін тотыға фосфорлану процесі арқылы түзеді. Қалыпты физиологиялық жағдайда, ОБТ түзілу процесі кешен I-дің белгілі бір бөлігімен реттеледі [159-164]. Алайда, егер электрон тасымалдау тізбегі тотыға фосфорлану процесінің гендік мутациясымен тежелсе не қалыптан тыс калорийді тұтынудан кейін айтарлықтай азайса, онда ЭТТ электрон тасымалдаушылары супероксид анионды ($O_2^{\bullet-}$) түзу үшін $O_2$ тікелей беріле алатын қалыптан тыс электрондарды жинақтайды. Кешен I-мен түзілген $O_2^{\bullet-}$ митохондриялық матрикске босап шығады. Мұнда олар MnSOD арқылы сутегінің асқын тотығына ($H_2O_2$) айналады. Кешен III-пен түзілген $O_2^{\bullet-}$ митохондрияның мембранааралық кеңістігіне босап шығады. Мембранааралық кеңістік пен цитоплазмада орналасқан мыс/мырыш супероксиддисмутаза ферменті арқылы $H_2O_2$ айналады. $H_2O_2$ төмен реактивтілікке ие молекула. Митохондриялық $H_2O_2$, содан соң ядро цитозолына енуі мүмкін. Егер $H_2O_2$ төмендетілген өтпелі металлмен кезіксе немесе $O_2^{\bullet-}$ араласса, онда $H_2O_2$ бұдан әрі, ОБТ ең күшті тотықтырғышына, яғни гидроксил радикалына ($OH^{\bullet}$) Фентон реакциясы арқылы айналуы мүмкін. ОБТ клеткадағы белоктарды, липидтерді және нуклеин қышқылдарды зақымдауы мүмкін. Демек, митохондриялық ОБТ шамадан тыс түзілуі клетканың антиоксидантты қорғанысын асыруы мүмкін.

Сондай-ақ кумулятивтік зақымдауға және ақыр соңында клетканы некроз немесе апоптоз процестері арқылы клеткалық өлімге алып келуі мүмкін [112, p. 300-314; 165, 166]. ОБТ түзілуінің төмен концентрациялары пролиферация, организмді қорғау, сигнал беру және гендік экспрессия сияқты физиологиялық қызметтерді сақтау үшін қажет [164, p. 50].

Азоттың белсенді түрлері (АБТ) де, митохондриялар арқылы түзілуі мүмкін. IV кешен жоғары оттегі қысымы кезінде $O_2$ өзінің терминалды электрон акцепторы ретінде пайдаланады. Дегенмен, төмен оттегі қысымы кезінде IV кешен нитритті азот оксидіне (NO) дейін азайта алады. Ашытқыда, митохондриялық тұрғыда өндірілген NO COX5b баламалы ядролық IV кешен суббірлігін тудырады. Ал ол өз кезегінде IV кешендегі NO түзілуін арттырады [167, 168]. Сондай-ақ NO азот оксиді ситазасының үш түрінің, яғни индуцибелді, эндотелий және нейронды түрінің көмегімен аргининнен және $O_2$ түзіледі [169-171].

NO қан жолдарын кеңейтушісі. Демек, IV кешенімен NO түзілуі оттегіге негізделген кері байланыс топтамасымен қамтамасыз етеді. Оттегі қысымы төмен болған жағдайда, IV кешен NO синтезіне қосылады. NO митохондриялар мен клеткалардан диффузияланып, қан тамырлардың тегіс бұлшықетті клеткаларының босаңсуын тудырады. Содан қан тамырлардың кеңейюіне әкеп соғады [172]. Бұл өз кезегінде ұлпаның оксигенациясын, яғни оттегімен қанықтыруды арттырады. Дегенмен, бұл жүйе қан жолдарын кеңейтетін құрал ретінде белсенді болмайтын пероксинитрит түзу үшін, митохондриялық $O_2^{\bullet-}$ NO байланысуын ескерсек, ЭТТ тежейтін және ОБТ түзілуін арттыратын генетикалық ақаулармен бұзылуы мүмкін. Пероксинитрит сульфгидрил топтары мен Fe-S орталықтарын тотықтыратын потенциалды реагент болып саналады. Сонымен қатар, пероксинитрит белоктардың қызметі мен құрылымына әсер ете алатын нитротирозиндерді түзетін белоктардағы тирозиндермен байланысады [173].

### 1.3 Қуық асты безі ісігі

1.3.1 Қалыпты қуық асты безі метаболизмі

Қуық асты безі ісігінің метаболиттік өзгерістерін түсіну үшін қалыпты қуық асты безі клеткаларындағы негізгі фенотипті түсіну маңызды. Адамның қуық асты безінің аралық метаболизмі барлық безді эпителий клеткаларында біркелкі емес [174]. Мәселен, анатомиялық тұрғыда қуық асты безі үш аймаққа (өтпелі, орталық және перифериялық) бөлінеді. Несеп жолының проксималды бөлігін қоршап тұратын бөлік өтпелі аймақ деп аталады, және барлық қуық асты безі қатерлі ісіктің 10%-ы осы аймақта орналасады. Орталық аймақ өтпелі аймақты қоршап, несеп жолының бұрышына және қуықтың негізіне дейін созылады; бұл жерде қуық асты безі қаатерлі ісігінің 5% дамиды. Перифериялық аймақ бездің басым бөлігін (70%) алады және қуық асты безі қатерлі ісіктің шамамен 80% осы аймақта орналасады. Перифериялық аймақта клеткалар қуық асты безінің орталық аймағындағы клеткалардан метаболизмі жағынан ерекшеленеді [175-178]. Перифериялық аймақтағы эпителий

клеткалары жоғары мамандандырылған секреторлық клеткалар болып табылады. Орталық аймақтағы және қалған бөліктеріндегі клеткалардан айырмашылығы, перифериялық аймақтағы клеткалар, негізінен, осы клеткалардағы мырыш сіңіру тасымалдаушының белсенділігі нәтижесінде мырыштың (3-10 есе жоғары) көп мөлшерін жинақтайды. Перифериялық аймақ клеткаларының митохондрияларында мырыштың жоғары концентрацияларының болуы м-аконитаза ферментінің белсенділігін тежейді, бұл цитраттың Кребс циклі арқылы тотығуына жол бермейді [176, p. 111-112; 179]. Бұл қалыпты қуық асты безі эпителийлерінде мырыштың жинақталуы осы ұлпадағы мырыш тасымалдаушысының ZIP1 санын арттыру арқылы қол жеткізіледі [180]. Цитрат жинақталғанда, қалыпты қуық асты безі эпителий клеткалары Кребс циклін тоқтатады және сондықтан АҮФ синтезіндегі ағзаның көптеген клеткалардан өте көп ерекшеленеді [181]. Жиналған цитрат шәуетке шығарылады. Жоғары мырыштың жинақталуы митохондриялық тыныс алуды және терминалды электрон тасымалдауды тежейді. Осылайша, қуық асты безінің қалыпты эпителий клеткалары қысқартылған Кребс циклы, төмен тыныс алу және төменгі терминалдық тотығу сипатымен ерекшелінеді. Сондай-ақ, энергия көздері бойынша тиімсіз және шамасы аз ОБТ-рін түзеді. Бұл эпителий клеткалары, басқа клеткаларда орын алатын ОБТ-нің өндірісіне қосылмаған энергия өндірісінің альтернативті метаболиттік жолдарына ие болуы мүмкін. Митохондриядағы осындай төмен ОБТ-нің түзілуі антиоксидант гені экспрессиясының төмендеуімен (мысалы, *GPX1*) байланысты болуы мүмкін. Демек, бұл перифериялық аймақтағы қалыпты клеткалар басқа клеткалар түрлеріне қарағанда ОБТ-не төмен толеранттылығы болуы мүмкін [174, p. 11-12; 182].

### 1.3.2 Қуық асты безі ісігінің негізгі метаболиттік өзгерістері

Ісік клеткаларындағы клеткалық метаболизмінің өзгеруі ісіктің дамуымен бірге жақында қатерлі ісік трансформацияның белгісі ретінде танылды [183, 184], бірақ метаболизмді қайта бағдарламалаудың биологиялық ерекшеліктері әртүрлі қатерлі ісіктерде ғана емес, сондай-ақ қатерлі ісік түріндегі әртүрлі клеткалар арасында да ерекшеленеді. Қалыпты қуық асты безінің эпителий клеткалары ерекше және өте тиімсіз энергетикалық метаболизмге ие, себебі олар шәуеттің бөлігі ретінде шығарылатын цитратты синтездеу үшін глюкозаны пайдаланады. Трансформация процесінде қуық асты безі қатерлі ісік клеткалары өздерінің энергетикалық метаболизмін тиімсізден жоғары тиімділікке дейін өзгертеді, жиі катаболикалық және анаболикалық процестерде қатерлі ісік клеткалары қолданатын метаболиттік аралық өнімдерді түзетін және секрециялайтын бұзылған ісік микроортасында басқа клеткалармен өзара әрекеттесуді пайдаланады [185]. Дифференциалды эпителий клеткаларында цитрат глюкоза метаболизмінің соңғы өнімі болып табылады және қуық асты безі клеткалары тотыға фосфорлануының өте төмен деңгейін және гликолиз жылдамдығының ұлғайуын көрсетеді [185, p. 2-4; 186].

Цитрат/мырыш. Жоғарыда айтылғандай, қалыпты қуық асты безі эпителий клеткасының ерекшелінетін белгісі - цитрат синтезі фенотипін жинақтайтын мырышы болып табылады. Дегенмен, қуық асты безінің қатерлі ісік клеткаларының ішінде анық көрінетін өзгерістер орын алады. Қуық асты безі қатерлі ісік клеткалары осы фенотиптің бағытын кері өзгертеді және мырыштың ысыраптауын, цитрат тотығу фенотипін қабылдайды, осылайша энергетикалық зат алмасудың үлкен өзгерісін көрсетеді [187]. Бұл ауысым осы клеткаларға Кребс циклін және кейіннен тотыға фосфорлануын пайдалануға мүмкіндік береді. Ұзақ уақыт бойы анықталғандай, қуық асты безі қатерлі ісігі көптеген қатерлі ісік түрлерінде байқалған стандартты Варбург әсеріне сәйкес келмейді. Аэробты гликолизге шалдыққан ісік клеткаларының көпшілігінен айырмашылығы, қуық асты безі қатерлі ісік клеткалары лимон қышқылы циклінің белсенділігі қалыпты клеткалармен салыстырғанда жоғары болады [176, p. 113]. Мырыштың жинақталуы қуық асты безі клеткаларында митохондриялық апоптоздық фенотипке әкелуі мүмкін. Сондықтан, қатерлі ісік клеткалар клеткалық өлімін болдырмау үшін сақталған мырыш мөлшерін азайтады [188]. Қатерлі ісік клеткалардағы мырыштың төмендеуі ZIP1 мырыш тасымалдаушысының өзгерістеріне байланысты болуы мүмкін [187, p. 739]. Бұл тасымалдаушылардың өзгеруі мырыш концентрациясының м-аконитазаны тежеуге жеткілікті деңгейге дейін жетуіне мүмкіндік бермейді. Осылайша, қуық асты безі қатерлі ісігіндегі өзгерген мырыш пен цитрат фенотипі қосарлы рөлге ие екендігін дәлелдеді. Цитраттың тотығуына қайтару ғана емес, клеткалардың өсуі үшін қол жетімді энергияны көбейтеді, сонымен қатар мырыш концентрациясын жоғарылату арқылы бұл клеткалар апоптозды реттеуге жол бермейді [179, p. 144-147].

Глутамин. Глутамин клеткаларда көптеген энергетикалық жолдарға қатысады. Қатерсіз клеткалардағы негізгі жолдардың бірі глютаматқа глутаминаза арқылы айналу болып табылады. Бұл глутамат α-кетоглутаратқа айнала алады, содан кейін Кребс циклына ауысады және клеткалық АҮФ түріндегі энергияны өндіреді [181, p. 3; 189]. Көптеген клеткаларда, соның ішінде қуық асты безі ісігінде глутаминді сіңіру және пайдалану жоғарылайтыны көрсетілген, көбіне *de novo* липид синтезі үшін және клетка қабырғаларының құрылысы сияқты процестерге ықпал етуі мүмкін. Ісіктерде жиі байқалатын гипоксиялық жағдайларда, протеиннің изоцитрат дегидрогеназа 1 глютаминдік метаболизмі липидті қалыптастыруға ықпал етеді. Алайда бұл механизм әлі күнге дейін толық түсінікті емес [190]. Глутаминолиз бұл АҮФ түзу үшін ісік клеткалары қолданатын процесс. Глутаминолиз қуық асты безі ісік клеткаларында көбінесе глутаминаза-1 ферменті арқылы орындалады. Глутаминаза-1 жоғары реттелуі қуық асты безі ісігінде көрсетілген [191, 192]. Осылайша, теориялық тұрғыдан глютаминаза-1 әсерін тежеу қуық асты безі ісік клеткаларының глутамин негізіндегі энергия өндірісін бұзуы мүмкін. Шынында, *in vitro* зерттеу глутаминді сіңіру тежелуі қуық асты безі қатерлі ісігінің пролиферациясы мен инвазиясын шектейтінін көрсетті [193]. Осылайша, клиникалық түрде глутаминнің сіңірілуін шектеу мүмкіндігі

қызығушылық тудырды. Глутаминолиз ҮҚЦ үшін көміртегі және азот топтарының көзі болып табылады және НАДФН өндіреді. Сонымен қатар, глутамин митохондрияның мембраналық потенциалын сақтау және белоктарды, липидтерді және нуклеотидтерді синтездеу үшін митохондриялық көміртек қорына әсер етеді [194-196].

Глюкоза. Қуық асты безі ісігінің глюкоза метаболизмінің нақты рөлі анықталмаған, бірақ оның аурудың дамуына және клетка бөлінуіне қатысатыны анықталған [197]. Қант диабеті бар адамдар мен қатерлі ісік фенотипінің ауырлық дәрежесінің артуы глюкоза метаболизміне байланысты [198]. Әдетте, ісік клеткалары энергия мен биомасса өндіру үшін жоғары гликолизге ие болады [199]. Аэробты гликолиз бастапқы қуық асты безі қатерлі ісігінің метаболиттік белгісі болмаса да [200], жоғары гликолитикалық фенотип қуық асты безі қатерлі ісігінің ілгері кезеңдерінде сипатталған. GLUT1 - трансмембраналық глюкоза тасымалдаушысы және қуық асты безі қатерлі ісігінде шамадан тыс экспрессияланады, сондай-ақ андроген рецепторымен реттеледі. Бірнеше факторлар, ең алдымен айқын гипоксия, клеткалық мембраналардағы GLUT1 экспрессиясын ұлғайта алады, содан соң, глюкоза сіңіруін күшейте алады [201].

### 1.3.3 Қуық асты безі ісігі кезіндегі Варбург эффектісі

Метаболиттік өзгерістер ісік клеткаларына жылдам пролиферациясы үшін үлкен энергия талаптарын қанағаттандыруға мүмкіндік береді. Қатерлі ісіктердің көпшілігі 1900-шы жылдардың ортасында Отто Варбург сипаттағандай, аминқышқыл фосфорланудан аэробты гликолизге дейін АҮФ өндірісінің негізгі жолын өзгерткен Варбург эффектісіне тап болады. Бұл ауысу ісік клеткаларының энергияның қажеттіліктерін қанағаттандыру үшін глюкозаны сіңіру жылдамдығын айтарлықтай арттыратындығын білдіреді. Клиникалық түрде F-дезоксиглюкозды позитрон эмиссиясының томографиясы (FDG PET) осы ерекшелікті пайдаланады, себебі инфузиялық радиоактивті түрде таңбаланған глюкоза ісік клеткалары арқылы әлдеқайда жоғары жылдамдықпен сіңіріледі, содан кейін олар визуализация арқылы анықталады. Бұл әсер туралы нақты түсініктеме талқыланды, бірақ тотыға фосфорлануды болдырмау, митохондриялық стреске әкелетін ықтимал жолдар мен өнімдердің ыдырауынан алшақтауға мүмкіндік береді, ал бұл клеткалық бөліністі тоқтата алады [109, p. 275-276]. Сонымен қатар, глюкоза тәрізді өнімдердің толық емес ыдырауы, пролиферация үшін қажетті клеткалық құрылымдық блоктарды тез құруға мүмкіндік береді. Толық тотыға фосфорлану, керісінше, энергия көзін көмірқышқыл газға дейін ыдырауына әкеледі, бұл ісіктің биомассасына әсер етпейді. Аэробты гликолизге сүйене отырып, бұл клеткалар жылдам бөлініп, биомассаны ұлғайтуды жалғастыра алады [202].

Көптеген ісік клеткалары осы Варбург эффектісін ұстанады, ал қуық асты безі ісігінің айтарлықтай өзгеше фенотипі болады. Жоғарыда айтылғандай, қуық асты безі ісігі клеткалары базалық деңгейде тотыға фосфорланудан бас тартады. Ерте сатыдағы қуық асты безі ісігі аэробты тыныс алудан гөрі, энергия

өндірісі үшін липидтер мен басқа энергетикалық молекулаларға сүйенеді [203, 204]. Сондықтан, Варбург эффектісі қуық асты безі қатерлі ісігінің патогенезінде дәйектілікке ие болмайды, өйткені бұл клеткаларда глюкоза сіңірілуінің жоғарылауы жоқ [205]. Бұл клиникалық тұрғыдан маңызды, себебі бұл ісікіктер FDG PET сканерлеу кезінде пайда болмайды. Қуық асты безі қатерлі ісігі көптеген мутациялары бар кеш сатысында, яғни метастатикалық сатысында ғана Варбург эффектісін көрсете бастайды және глюкозаның жоғары сіңірілуіне ие болады [206, 207]. Қуық асты безі қатерлі ісігі клеткаларының биоэнергетикасының нақты сипаты зерттелуде және төменде талқыланған нақты жолдар бойынша жұмыс жүргізілуде.

1.3.4 Қышқыл орта жағдайындағы ісік клеткаларының энергетикалық метаболизмі

Көптеген дәлелдемелер ісік микроортасының ісік клеткалардың метаболиттік қайта бағдарламалауында айтарлықтай үлес қосатынын көрсетеді [208, 209]. Зерттееушілердің назары ісіктердің айналасындағы ұлпалардың кейбір молекулалық компоненттеріне [210], сонымен қатар қатерлі трансформациялардан туындаған немесе пайда болған pH пен иондық тепе-теңдіктің өзгеруіне аударылды [211, 213, 214]. Калий мен басқа иондардың аномальді таралуы қуық асты безі ісіктің және басқа да қатерлі ісіктердің таралуына әсер етеді [215-218]. Жергілікті кальций жетіспеушілігі ісіктің дамуы мен метастазденуды қоздыруы мүмкін екендігін көрсетеді [219, 220]. Сонымен қатар, ацидоздың оттегінің белсенді түрлерінің жоғарылауына ықпал етуі зерттелді [221, 222]. Өлшенген ісіктің pH мәндері 6,6-6,8 аралығында, ал үлкен жараланған ісіктерде төменірек pH мәндері (5,8-6,3) байқалды [223-225]. Ісік клеткалары қоршаған ұлпаларға қатысты өздерінің паразиттік жағдайын қамтамасыз ету үшін, күрделі ісік микроортасын өзгертуге қабілетті болып келеді [226, 227]. Бұл адаптивті жағдай қарқынды қан айналымының болмауына байланысты глюкозаға мүмкіндігі шектеулі қатты ісіктерде айтарлықтай болып табылады. Сонымен бірге, глюкозаны негізгі энергетикалық субстрат ретінде пайдаланбайтын және өздерінің жоғары энергия қажеттіліктерін ұстау үшін интерстициалды сұйықтықта болатын альтернативті энергетикалық метаболиттерді қолдануға мәжбүр болатын қуық асты безі ісігі сияқты клеткаларда да айтарлықтай болады. Ісік клеткаларының митохондриясы қоршаған ұлпалардың дегенерациясын тудыратын мезенхималды клеткалардың, глутаматтың, глутаминнің және ҮҚЦ тыныс метаболиттерінің циркуляциясын бұзады. Бұл аутофагияның, кахексияның және митофагияның даму механизмдерін түсіндіре алады. Дегенмен, ісік клеткаларды клеткадан тыс заттармен қарқынды қамтамасыз етуге мүмкіндік беретін тікелей механизмдері анықталмаған. Тыныс алу жолдарының субстраттары үшін интактты клеткалардың шектелген өткізгіштік қабілеті биоэнергетиканың негізі болып табылады [228]. Плазмалық мембрана тұтастығы үшін клеткаларға сукцинатты қосу жолымен респирометрлік тестілеу - белгілі әдістемелік тәсіл болып табылады [229], онда интактты

клеткалардың сукцинат қатысында жоғары тыныс алуы, сөзсіз плазмалық мембрана бұзылуының дәлелі ретінде қарастырылады. 1960 жылдан бері ғалымдар сукцинатты плазмалық мембрана арқылы тасымалдауға назар аударды. Май клеткаларында сукцинат пен α- глицерофосфатты қосқан кезде жедел тыныс алу байқалды [230, 231]. Ісік клеткаларына қатысты 1976 жылы Т. Спенсер келесі мәселеге ерекше назар аударды, қышқыл жағдайда Эрхлихтің асцитті ісік клеткалары сукцинатты цитозолға тасымалдауға қабілетті екенін көрсетті, бірақ ол тасымалдау механизміне назар аудармады [232]. Мұнда ескеретін жәйт, сукцинат басқа тыныс алу метаболиттерімен бірге митохондриялар матрицасында түзіледі және интерстициалды сұйықтықтарда анықталады. Бұл сукцинаттың және басқа метаболиттердің шамадан тыс жинақталуына әкелетін метаболикалық теңгерімсіздіктің нәтижесі болуы мүмкін, соңында олар клеткалардан босатылады. ҮҚЦ аралық өнімдерінің плазмалық деңгейі патология, диета және метаболиттік жағдайларға байланысты өзгеретіні көрсетілді [233, 234]. Адам қанындағы сукинаттың қалыпты концентрациясы әртүрлі зерттеулерде 2-ден 40 мкМ дейінгі диапазонда көрсетілген [235, 236]. Кейбір патологиялық жағдайларда, оның ішінде гипоксия [237] немесе қарқынды жаттығулар [238] кезінде сукинаттың плазмадағы деңгейі жоғарылайды. Ишемиялық зақымдану кезінде сукинаттың селективті жинақталуы зерттелген [239]. Ісіктерде масса ауқымындағы некроздық аймақтар ҮҚЦ метаболиттерінің қосымша мөлшерін қамтамасыз ете алады. Дегенмен, дене сұйықтықтарында жоғары сукцинат мөлшері ісік метаболизмінің ерекше белгісі болып табылады [240].

Сукцинат зарядталған зат болғандықтан, тек белгілі бір тасымалдаушылар ғана мембрана арқылы тасымалдауды жүзеге асыра алады. Сукцинат, малат, цитрат, α-кетоглютарат тәрізді дикарбон қышқылдарының тасымалдаушылары плазмалық және плазмалық мембрана түрлерінде де кездеседі. Митохондрияның ішкі мембранасына тән фосфат тәуелді дикарбон қышқылы тасымалдаушысы *SLC25A10* генімен кодталады [241]. Плазмалық мембраналық $Na^+$-тәуелді дикарбон қышқылы тасымалдағышы жоғары (NaDC3) және төмен (NaDC1) аффинді изоформалар мен натрийге тәуелді цитрат тасымалдаушысы (NaCT) ретінде *SLC13A3*, *SLC13A2* және *SLC13A5* гендерімен сәйкесінше кодталады [242-244]. Бүйрек, бауыр, плацента, ішек, сондай-ақ ми синаптосомдары сияқты ағзамүшелері NaDC3 тасымалдағышының жоғары аффинді изоформасын экспрессиялайды. Ал оның NaDC1 төмен аффинді аналогы көбінесе ішекте және бүйректе экспрессияланады [242, p. 663-667; 245-248]. Қуық асты безі қатерлі ісігіне қатысты жоғары метастатикалық PC-3M клеткалары цитратты ішке тасымалдауды қамтамасыз ететін ұқсас $Na^+$-тәуелді тасымалдағышты экпрессиялайтынын көрсетті [249], бірақ қуық асты безінің қалыпты PNT2-C2 клеткалары физиологиялық pH жағдайында сыртқы $K^+$-жанама цитрат тасымалдаушысын экспрессиялайды [250].

# 2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ

## 2.1 Зерттеу материалдары

Зерттеу материалдары ретінде төмен температуралық плазманың әсеріне ұшыраған адамның қуық асты безінің DU145 ісік және PrEC қалыпты эпителий клеткалары қолданылды.

## 2.2 Зерттеу әдістері

2.2.1 Клетка линиялары мен олардың өсу жағдайлары

DU145 адамның қуық асты безінің эпителий ісік клеткалары Американдық типтік культуралар коллекциясынан (American Culture Collection – ATCC, Манассас, АҚШ) және PrEC адамның қуық асты безінің эпителий қалыпты клеткалары Lonza Inc. компаниясынан (Аллендейл, АҚШ) алынды. DU145 клеткалары 60 және 70 пассаж аралығында 10% FBS (феталды бұзау сарысуы, Gemini Bio-Product, Сакраменто, АҚШ) қосылған L-глутамині бар RPMI-1640 қоректік ортасында (Gibco Invitrogen Corporation, АҚШ) өсірілді, ал PrEC қалыпты клеткалары 2 және 5 пассаж аралығында PrEGM SingleQuots компоненттері (бұзау гипофизінің экстракты, гидрокортизон, hEGF, эпинефрин, трансферрин, инсулин, ретиноидтық қышқыл, трийодтиронин) қосылған PrEBMTM (Lonza Inc., АҚШ) қоректік ортасында өсірілді. Сонымен қатар, кейбір тәжірибелерде, қосымша клетка линиялары ретінде доктор Б. Поляк (B. Polyak) (Дрексель университеті, Филадельфия, АҚШ) арқылы алынған RAEC егеуқұйрықтың аорталы эндотелий клеткалары және доктор В. Боун (W. Bowne) (Дрексель университеті, Филадельфия, АҚШ) арқылы қамтамасыз етілген SKOV-3 адамның аналық безінің эпителий ісік клеткалары пайдаланылды.

Клеткаларды төмен температуралық плазмамен өңдеуден бұрын 12 сағат бойы жоғарыда аталған қоректік орталарда температурасы 37°C және 5% $CO_2$ атмосфералық жағдайларында өсірілді.

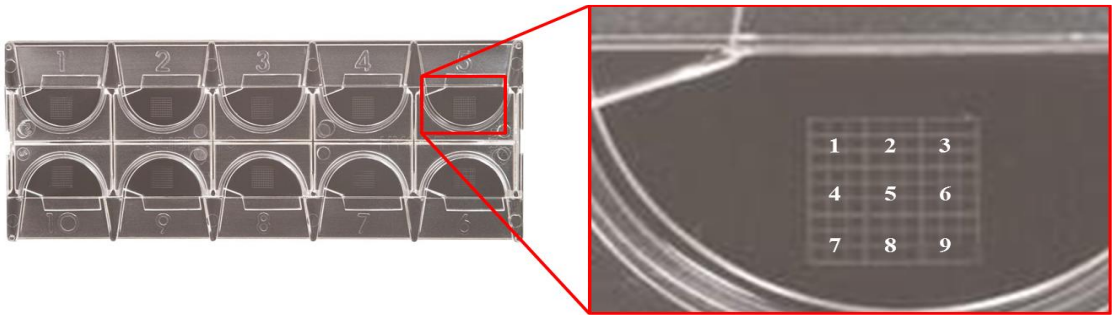
2.2.2 Клеткаларды гемоцитометрде санау әдісі

Клеткаларға трипсин қосу арқылы қайта егу процесі кезінде олардың жағдайын бағалауға, яғни клеткалардың жалпы санын санауға, сондай-ақ олардың арасында өлі және тірі клеткаларды анықтауға болады [251]. Осы мақсаттар үшін клеткаларды санаудың қарапайым әдісі – гемоцитометр құралы (Hycor Biomedical Inc. компаниясы шығарған торлары бар Kova Glasstic 10 слайдты құрал, Кат.№ 87144) қолданылды (7-сурет).

7-суретте көрсетілгендей әрбір сызықталған аймақ (әр камера) 9 үлкен квадраттан тұрады. Камераның сипаттамасы: камераның көлемі - 6,6 мкл; камераның тереңдігі - 0,1 мм; сыртқы тордың өлшемі - 3 мм × 3 мм; тордың ішкі көлемі - 0,9 мкл; кіші тордың өлшемі - 0,33 мм × 0,33 мм; кіші тордың көлемі - 0,01111 мкл [252].

Клеткалық суспензия бөлігін (10 мкл) дозатормен алып, гемоцитометрдің санау камерасын толтырады. Қол санауыштың көмегімен бұрыштардағы төрт үлкен

квадраттар ішіндегі (7-суреттегі 1, 3, 7 және 9 квадраттар) клеткалардың саны есептелді. Оң және жоғарғы жақтарындағы шектелетін сызықтарымен жанасқан клеткалар саналды, ал сол және төменгі жақтарындағы шектелетін сызықтарымен жанасқан клеткалар саналмады.




Сурет 7 – Клеткаларды санауға арналған торлары бар Kova Glasstic 10 слайдты құрал [252]

Ұяшық қоспасындағы клеткалардың шамамен алғандағы концентрациясы келесі формула көмегімен есептеліп шығарылды [251, с. 8-9]:

$$\frac{(\frac{1+3+7+9}{4})}{36} x90x1000 = n \quad (19)$$

мұндағы, (1+3+7+9) / 4 – бұл 1, 3, 7 және 9 квадраттардағы клеткалардың орташа саны; 36 – бұл 4 үлкен квадраттардағы кішкентай торлардың саны (яғни, 1 үлкен квадрат (ү.к.) = 9 кішкентай торлар (к.т.), сәйкесінше 4 ү.к. = 36 к.т.); 90 - фактор, яғни клеткаларды микролитрде алу үшін шағын торлардағы клеткалардың орташа саны 90 санына көбейтілді; 1000 – 1000 есеге сұйылту; n – 1 мл (1000 мкл) суспензиядағы клеткалардың саны.

2.2.3 Клетка культураларын мұздату және еріту әдістері

Клетка культураларын келесі зерттеулер мен тәжірибелерге сақтап қалу үшін, олар -86°C температуралық мұздатқышта стандартты әдіспен қатырылды [251, с. 9-11].

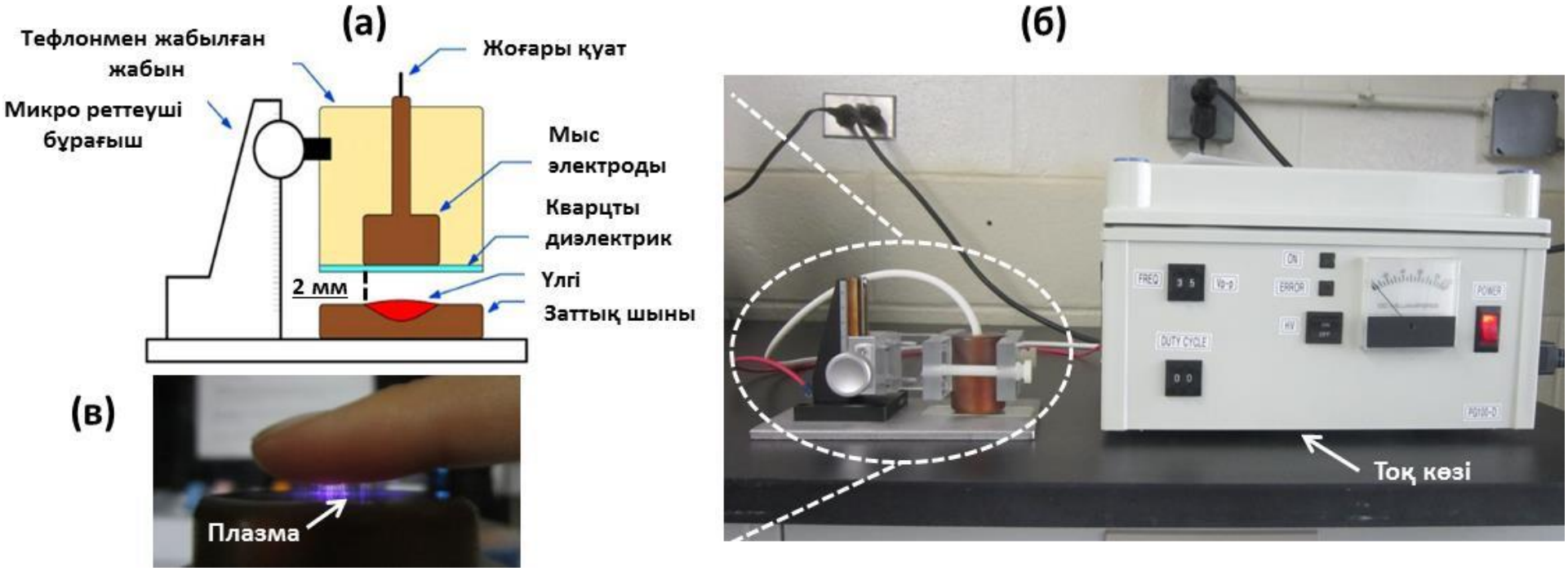
Клеткаларды мұздату кезінде алдымен оларды 1-2 мл 0,05% трипсин ерітіндісімен дезагрегацияға ұшыратылды және термостатта 37°C мен 5% $CO_2$ қатысында 5 мин бойы инкубацияланып, алынған клетка суспензиясы 1500 айн/мин 5 мин центрифугаланды. Центрифугалаудан кейін супернатант төгіліп, қалған клеткалар тұнбасын DU145 клеткалар линиялары үшін құрамында 7% диметилсульфоксид (ДМСО), 20% FBS ерітіндісінің үлгісі және 73% болатын қоректік ортасымен, ал PrEC клеткалары үшін құрамында 5% ДМСО, 10% фосфатты-тұзды буфер (PBS) және 75% қоректік ортасы бар сұйықтықпен қайта араластырылды. Диметилсульфоксид клетка мембранасынан жеңіл өтеді және клеткаішілік, сондай-ақ клетка сыртын қорғауды қамтамасыз етеді [253].

Келесі ретте алынған қоспа 0,5 мл (кемінде $10^6$ клетка/мл) криопробиркаларға құйылып, құрғақ мұзы бар бокста 30 мин ұсталды. Содан соң, клеткалар бар криопробиркалар -86°С температуралық мұздатқышқа ауыстырылды. Бұл мұздатқыш клеткалық культураларын ұзақ уақыт бойы мұздатылған жағдайда сақтап тұруға көмектеседі.

Клеткаларды жылдам еріту үшін клеткалары бар криопробиркалар 37°С температурада су моншасында жібітілді немесе толық ерігенге дейін бөлме температурасында ұсталды. Еріткеннен кейін, криопробиркалар су моншасынан алынып, 70% этанолмен зарарсыздандырылды. Содан соң, клеткалық суспензияны ДМСО әсерінен бейтараптандыру үшін 5 мл қоректік ортасы (RPMI-1640 немесе PrEBMTM) бар центрифугалық пробиркаға ауыстырылды. Содан кейін, клеткалар 1500 айн/мин 5 мин бойы центрифугаланып, алынған супернатант төгіліп, клеткалар жаңа өсу ортамен қайта суспензияланылып, жаңа Т-75 фласк ыдыстарына отырғызылды. Клеткалық линияларды мұздату және еріту жұмыстары қатаң санитарлық-гигиеналық талаптарға сай және қауіпсіздік ережелер сақтала отырып клеткаларды өсіруге арналған арнайы бокста орындалды.

2.2.4 Атмосфералық төмен температуралық плазманы өндіру және клеткаларды өңдеу тәсілі

Клеткаларды плазма арқылы өңдеудің екі жолы белгілі: тікелей және жанама әсер ету. Осы тәжірибеде, клеткаларды плазмамен өңдеудің екінші (жанама әсер ету) жолы қолданылды, яғни ең алдымен сұйықтық, мысалы PBS ерітіндісі плазмамен өңделіп, содан соң клеткаларға қосылды. Атмосфералық қысымды төмен температуралық плазманы алу үшін, [11, p. 3; 254] әдебиеттерде сипатталған құрылғы қолданылды (8-сурет). Плазма жоғары вольтты электродтар арасындағы магнитудасы 20 кВ (бір пиктен екінші пикке дейін), импульс ұзақтығы 1,65 мкс және өсу уақыты 5 В/нс импульсті айнымалы полярлық кернеуін (500 Гц -1.5 кГц) қолдану арқылы айнымалы кернеу мен жиілікті қуат көзін (Industrial Test Equipment Co. Inc. компаниясы, АҚШ және Quinta LTD компаниясымен, Ресей бірлесіп шығарған қондырғысы) пайдалана отырып өндірілді. Диаметрі 2,54 см мыс электродты жабатын қалыңдығы 1 мм кварц шыны оқшаулаушы диэлектрлік тосқауыл (ДТР) ретінде пайдаланылды. Жерге тұйықталған тор электрондар мен иондарды бұғаттау үшін жоғары вольтты мыс электроды мен орта беті арасында орналастырылған, және ортаға зарядталмаған газ түрлерінің ғана өтуіне мүмкіндік береді. Плазмамен өңделген сұйықтықтар, соның ішінде деионизацияланған су, PBS және N-ацетил-цистеин (NAC) делдалдығы арқылы тікелей емес (жанама) плазманы қолдану түрлі мақсаттар үшін бағаланды [255]. Бұл жұмыста плазмамен өңделетін сұйықтық ретінде PBS ерітіндісі (құрамында $Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$ жоқ) таңдап алынды.




(а) ДТР құрылғысының сызбанұсқалық көрінісі (б) ТТП өндіретін құрылғының жалпы тәжірибелік құрылымы; (в) Тірі ұлпаның электродпен жанасуы арқылы түзілген ТТП тірі клеткалар үшін қауіпсіз.

Сурет 8 – Атмосфералық қысымды төмен температуралық плазма өндіретін құрылғы

Клеткаларды плазмамен өңдеу кезінде 1-кестеде көрсетілген плазма дозалары қолданылды (толық мәліметтер бұл жұмыстың зерттеу нәтижелері және оларды талқылау бөлімінде көрсетілген).

Кесте 1 – Плазма дозаларының параметрлері

| Плазма дозалары | Жиілігі, Гц | Қуаты, Вт | Өңдеу уақыты, секунд |
|---|---|---|---|
| Д 1 | 100 | 2,4 | 5 |
| Д 2 | 100 | 2,4 | 10 |
| Д 3 | 100 | 2,4 | 15 |
| Д 4 | 100 | 2,4 | 20 |
| Д 5 | 100 | 2,4 | 30 |
| Д 6 | 250 | 2,2 | 20 |
| Д 7 | 250 | 2,2 | 30 |

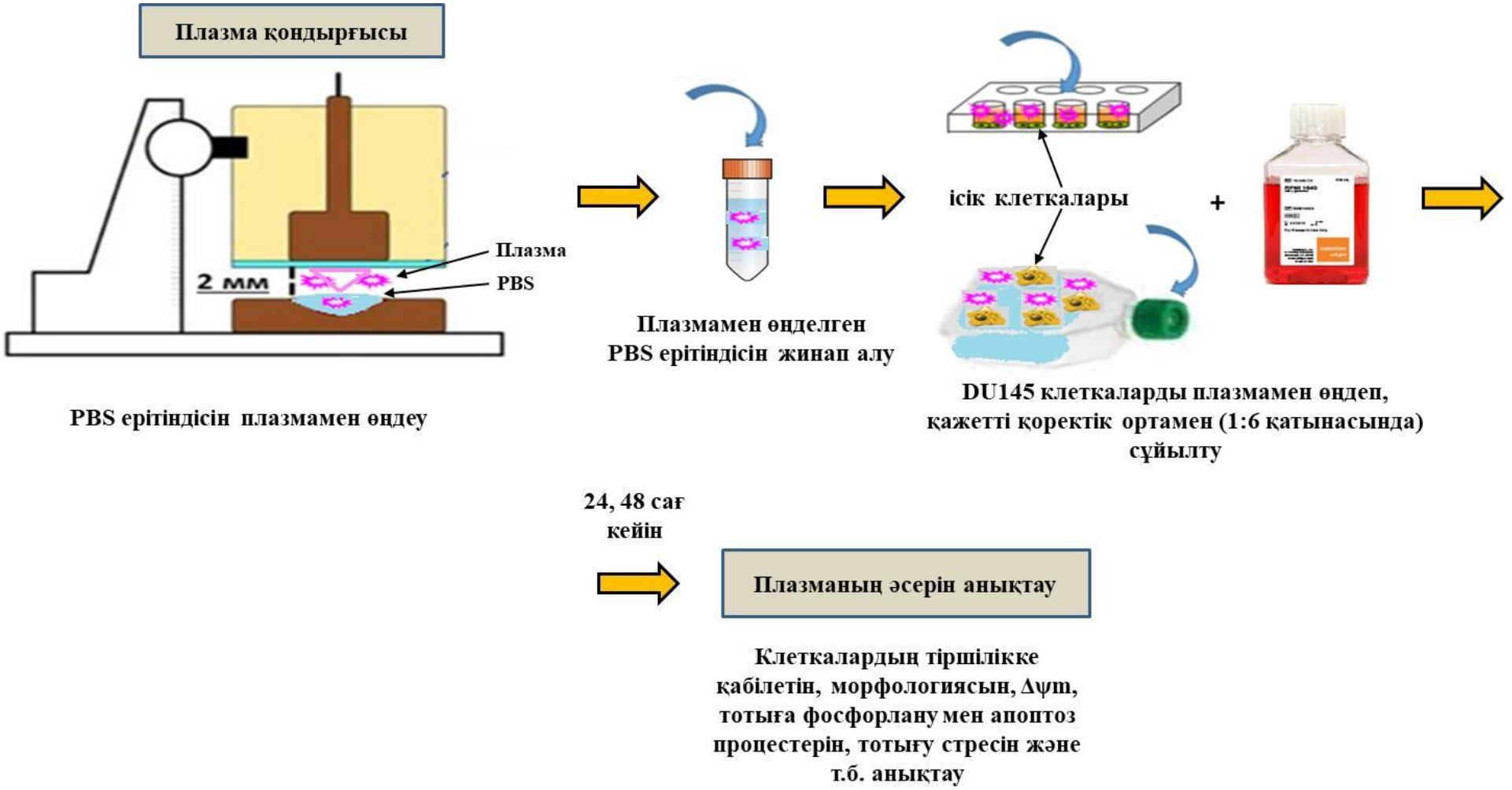
Клеткаларды моноқабатты қоректік ортамен шайып, келесі ретте 1 немесе 10 минут бойы плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің үлгісімен өңделген соң, осы ерітінді көлемі 1:15 (плазма-PBS:RPMI қоректік ортасы) қатынасындағы жаңа толық қоректік ортасымен сұйылтылды. Төмен температуралық плазмамен жұмыс істеудің жалпы реті 9-суретте көрсетілген.

2.2.5 *Alamar Blue* талдауы арқылы цитотоксикалық әсерді анықтау

Қуық асты безінің қалыпты PrEC және ісік DU145 клеткаларына төмен температуралық плазманың цитотоксикалық әсері *Alamar Blue* талдауы арқылы 24 және 48 сағаттан соң бағаланды [256]. Бұл үшін клеткалар 96-ұяшықты планшетке (10000 клетка/ұяшыққа) отырғызылды. 24 және 48 сағаттан соң бақылау (төмен температуралық плазмамен өңделмеген) және тәжірибе жағдайындағы (1 және 10 минут бойы төмен температуралық плазмамен өңделген) клеткалар 2 сағат бойы 37°C температурада толық қоректік ортада дайындалған 50 мкл 3% *Alamar Blue* ерітіндісінде инкубацияланды. Флуоресценция сигналы (эмиссия 585 нм) *BioTek Synergy 4* микропланшетті құрылғысында (Виноoский, АҚШ) талданды.

2.2.6 Колоногендік клеткалардың өміршеңдігін талдау

Төмен температуралық плазманың антипролиферативтік әсерін тексеру үшін DU145 (20000 клетка/ұяшықта) және PrEC (30000 клетка/ұяшықта) клеткалары 6-ұяшықты планшетке егілді және 10-14 сағат бойы инкубацияланды. Клеткалар 200 мкл плазмамен өңделген PBS ерітіндісінде (доза 7) 1 және 10 минут бойы экспозицияланды, ал содан кейін 3 мл толық қоректік орта (1:15 қатынасында) қосу арқылы бейтараптандырылды.




Сурет 9 – Төмен температуралық плазмамен жұмыс істеу сызбанұсқасы

Клеткалар 6 күн бойы өсірілді. Колониялар 5 минут бойы бөлме температурасында 3,7% параформальдегидпен бекітілді, PBS ерітіндісімен шайылды, содан кейін 30 минут бойы 0,05% кристалды күлгін бояуымен боялды. Бояудан кейін, клеткалар ағын сумен (құбыр суы) жуылып, бірнеше минут кептірілді. Содан кейін, боялған колониялар *Leica MZ16F* стереомикроскопында (Хербруг, Швейцария) бақыланып, *ImageJ NIH* бағдарламалық құралы арқылы талдаудан өткізілді.

2.2.7 Тринокулярлық микроскптың көмегімен клеткалардың морфологиясын бағалау

Зерттеу барысында клеткалардың саны мен морфологиялық құрылымы тринокулярлық микроскоп (Motic AE2000, АҚШ) көмегімен талданды. Ісік және қалыпты клеткалардың саны мен морфологиялық құрылымына плазма №7 үлгісі дозасының 1 және 10 минут бойы өңдеуінің әсері 24 және 48 сағаттан соң бағаланды.

2.2.8 Клеткалардың тотыға фосфорлануын өлшеу

Клеткалық тыныс алу 37°С температуралық жоғары дәлділікте екі камералы *OROBOROS Oxygraph-2K* респирометрінде (Инсбрук, Австрия) талданды [257, 258]. OUROBOROS DatLab бағдарламалық жүйесі деректерді жинау және талдау үшін пайдаланылды. Трипсин қосу және центрифугалау арқылы жиналған клеткалар ($1x10^6$ клеткалар/мл) плазмамен өңделген PBS ерітіндісімен 1 немесе 10 минут бойы инкубацияланды, содан кейін таза ортамен сұйылтылды. Содаң соң лезде немесе 24 сағаттан кейін плазмамен өңделген клеткаларды қоректік ортада инкубациялап, келесі ретте клеткалар 1500 айн/мин 5 минут ішінде тұнбаға түсірілді. Алынған тұнба құрамында 137 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 20 мМ MOPS, 2мМ $MgCl_2$ 1 мМ $KH_2PO_4$, 2мМ $CaCl_2$ (pH 7,4) қоспалары бар түрлендірілген Кребс буферінде қайта суспензия жасалды және клеткалардың тыныс алу қарқыны өлшенді. Тыныс алу қарқыны секундына бір миллион клеткалар ретінде көрсетілді. Жеке тыныс алу ферменттерінің тыныс алу белсенділігін бағалау үшін клетканың өткізгіш нұсқаулығы қолданылды.

2.2.9 Митохондриялардың мембраналық потенциалы мен морфологиялық құрылымын бағалау

Клеткалар ($0,2x10^6$) митохондриялардың мембраналық потенциалына ($\Delta\Psi m$) сезімтал 75 нМ *MitoRed* флуоресцентті зондымен (толқын ұзындықтары қозу/эмиссия 622/648 нм) (PromoCell GmbH, Гейдельберг, Германия) 20 минут бойы 37°С қараңғы жерде инкубацияланды. Тұнбаға түскен клеткалар құрамында $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ жоқ таза PBS немесе плазмамен (Д7) өңделген PBS ерітіндісімен араластырылды. Митохондриялардың мембраналық потенциалы *BD Accuri C6* ағынды цитометрде (BD Biosciences, Сан-Хосе, АҚШ) талданды. Оң бақылау ретінде алынған клеткалар мембраналардың толық деполяризациясын тудыратын және митохондриялардың тотыға фосфорлануын

ажырататын 2 мкМ карбонилцианид 4-(трифторметокси) фенилгидразон (FCCP) ерітіндісімен өңделді.

Сонымен қатар, 30 мм Петри табақшасына $0,3\times10^6$ тығыздықта отырғызылған клеткалар *Mito Tracker Orange* (25 нМ) флуоресцентті зонды бар 1 мл PBS буферінде 37°C, 5% $CO_2$ жағдайында 15 мин бойы инкубацияланды. *Mito Tracker Orange* – тірі клеткалардың митохондрияларына бірегей жоғары мембраналық потенциалын қолдану арқылы енетін флуоресцентті зонд. Инкубациядан соң клеткалар 2 рет PBS шайылып, оған 1 мл плазмамен өңделген PBS ерітіндісі қосылды және 1 немесе 10 минут бойы митохондриялардың потенциалы мен морфологиялық құрылымының өзгеруі *Olympus FluoViewTM FV1000* (B&B Microscopes Limited, Питтсбург, АҚШ) конфокалды лазерлі микроскопты қолдану арқылы бақыланды.

2.2.10 Тотығу стресін өлшеу

Төмен температуралық плазмалық өңдеуден алынған тотығу стресі *CM-H2DCFDA* және *MitoSox*, сәйкесінше, сутегі асқын тотығы және митохондриялармен түзілетін супероксид сезімтал бояғыштарымен флуориметриялық жағдайда талданды. Клеткалар ($0,2x10^6$ клетка) 2 мкМ CM-H2DCFDA (толқын ұзындықтары қозу/эмиссия 495/527 нм) немесе 5 мкМ MitoSox (толқын ұзындықтары қозу/эмиссия 510/570 нм) (Life Technologies, Гранд-Айленд, АҚШ) арқылы 15 минут бойы қараңғы жерде 37°C термошайқағышта, құрамы 5% $CO_2$ тұратын жағдайда инкубацияланды. Сутегі асқын тотығы ($H_2O_2$) және супероксид ($O_2^{\bullet-}$) деңгейінің өзгеруі *BD Accuri C6* ағынды цитометрде (BD Biosciences, Сан-Хосе, АҚШ) тексерілді. Оң бақылау клеткаларына I, II және III/IV тыныс алу кешендерінің ингибиторлары, тиісінше 1 мкг/мл ротенон, 500 мкМ малонат және 2,5 мкМ антимицин қосылды.

2.2.11 Клеткалардағы апоптоз процесін анықтау

Апоптоз процесінің маңызды реттегіштерінің біріне клеткалардың өлу индукторлары жатады, соның ішінде, апоптоз процесін тежейтін Fas (CD95, APO-1) беттік рецепторын және Bcl-2 туысының белоктарын алуға болады [259].

Соңғы жылдары *Annexin* туысына жататын белоктардың биологиялық белсенділігіне үлкен назар аударылуда. *Annexin V*, басқа аннексиндер сияқты, қалыпты клеткалардан бөлінбейді; клетка сыртындағы *Annexin V* көзі апоптозға ұшыраған және зақымдалған клеткалар болып табылады [260]. Басқа *Annexin* сияқты, *Annexin V* әсер ету механизмінде олардың теріс зарядталған фосфолипидтермен, соның ішінде фосфотидилсеринмен (ФС) байланысу қасиетінің зор мәнісі бар және олардың клеткалық мембранадағы экспозициясы (өңдеу уақыты) апоптоз процесінің ерте белгілерінің бірі болып табылады [261, 262]. Рекомбинантты *Annexin V* бұл қасиеті апоптоз процесіне ұшыраған клеткаларды анықтау және санау үшін қолданылады.

6-ұяшықты планшетке шамамен 15 сағатқа, $0,15\times10^6$ (150 мың клетка) тығыздықта 37°C температурада және 5% $CO_2$ жағдайында отырғызылған қуық

асты безінің қалыпты PrEC және ісік DU145 клеткаларының ескі қоректік ортасы төгіліп, PBS ерітіндісімен шайылды. Содан соң, 300 мкл таңдалынып алынған плазма дозасымен (Д7) 1 және 10 мин бойы әсер етіліп, 2 мл тиісті ортамен сұйылтылды, ары қарай, 24 және 48 сағ инкубацияға қойылды. Инкубациядан соң клеткалар трипсин қосу арқылы жиналды және апоптоз процесін анықтауға арналған жиынтықтың арнайы берілген нұсқауымен жүргізілді.

Клеткалардың апоптоз процесінің индукциясы *BD Accuri C6* ағынды цитометрде (BD Biosciences, Сан-Хосе, АҚШ) «*Alexa Fluor 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit*» жиынтығын (флюоресцеинизотиоционат (*FITC*) флюорохромымен коньюгацияланған *Annexin V* (*Annexin V-FITC* – апоптозды анықтауға арналған), пропидий иодиді (*PI* – некрозды анықтауға арналған) және бояуға арналған буфер) (Life Technologies, Гранд-Айленд, АҚШ) қолдану арқылы анықталды. Әрбір үлгіден 10000 клетканың флуоресценциясы алынды (толқын ұзындықтары қозу/эмиссия тиісінше, 488/525 нм *Annexin V* үшін және 488/675 нм *PI* үшін). Квадранттағы шекараны орнатуда келесідей бақылау үлгілері қолданылды. Олар: боялмаған клеткалар, *Annexin V-FITC* және PI боялған клеткалар. Бақылау үлгілеріндегі клеткалардағы *Annexin V-FITC* (*FL1*) және *PI* (*FL3*) флуоресценциясының қарқындылығы шашыраңқы жарықтың тура (*FSC*) және жанама (*SSC*) көрсеткіштері негізінде бағаланды. *Annexin+* және *PI+* клеткаларының саны қос өлшемді гистограмма (*DotPlot*) бойынша анықталды. Апоптоздық клеткалардың ерте апоптоздағы (Annexin+) саны гистограмманың төменгі бірінші квадрантында және кеш апоптоздағы клеткалардың (*Annexin+PI+*) саны гистограмманың жоғарғы бірінші квадрантында анықталды.

### 2.2.12 Клеткаларда цитозолдық кальций деңгейін өлшеу

Цитозолдық кальций модуляцияларының микроскоптық тәжірибелері үшін тығыздығы 200000 клетка түбі шыныдан жасалған 35 мм *MatTek* табақтарына (Маттек Corp., Ашленд, АҚШ) егілді. Клеткалар қоректік ортадан PBS-пен ($Ca^{2+}$ және $Mg^{2+}$ бар) шайылды және қараңғы жерде бөлме температурасында 15 минут бойы 2 мкМ *Fluo-4 AM* (қозу/эмиссия 488/560 нм) флуоресцентті зондымен таңбаланды. Таңбалаудан кейін клеткалар екі рет жуылды және тұрақтандыру үшін қосымша 15 минут буферде ұсталды. Клеткаларға 0,5 мл PBS ерітіндісі ($Ca^{2+}$ және $Mg^{2+}$ жоқ) құйылды, ал содан кейін 1 мл плазмамен өңделмеген PBS ерітіндісі немесе плазмамен өңделген PBS ерітіндісі қосылды. Цитозолдық кальций деңгейінің тұрақтылығы 50 мкМ АУФ қосу алдында 10 минут бойы бақыланды. Клеткалық өлшеулер клеткаішілік флуоресценция ауытқуын бақылау үшін, бір уақытта бейне кескіндерін және микро-флуориметрияларды беретін *Olympus FluoViewTM FV1000* конфокалды лазерлік сканерлеуші инверторлы микроскопын пайдалана отырып жүргізілді.

Кальцийдің ($Ca^{2+}$) митохондриялық матрикске жұтылуы клетка қызметінде өте маңызды болып табылады. Матрикстің $Ca^{2+}$ деңгейінің реттегіші ретіндегі бұл ағын энергияның түзілуіне әсер етеді және клеткалық өлімін индукциялауы

мүмкін [263]. Төмен температуралық плазма әсерінен митохондриялық кальций жағдайының өзгеруі конфокалды лазерлі микроскопта митохондриядағы кальцийге сезімтал - *Rhod-2 AM* (қозу/эмиссия 552/581 нм) флуоресцентті зондын қолдану арқылы жүргізілді.

2.2.13 Клеткалық лизаттарды дайындау және белоктарды Вестерн-блот әдісімен анықтау

Төмен температуралық плазмамен жүргізілген зерттеулер бойынша DU145 және PrEC клеткалары ($5x10^6$) тұтас клеткалық лизаттарды алу үшін жиналды және өңделді. 5 минут 2000 айн/мин центрифугалаудан кейін, клеткалық тұнба құрамында протеаза ингибиторлары (Roche, Индианаполис, АҚШ) бар 1 мл салқын *Ripa* буферінде ресуспензияланды және 4°C температурада 20 минут бойы шайқағышта инкубацияланды (лизиске ұшыратылды). Осыдан кейін, үлгілер 14000 айн/мин жылдамдықта 4°C температурада 15 минут центрифугаланды. Центрифугалаудан кейін алынған супернатант құрамында бромфенолы бар *4×Laemmli* үлгі буферінде (8% SDS, 240 mM TRIS-HCl pH 6,8, 40% глицерин, 0,02% бромфенол көк, 2% β-меркаптоэтанол) 1:3 қатынасында араластырылып, 100°C температурада 5 мин бойы инкубацияланды. Белок лизаттары (30 мкг белок) электрофорезде 12% полиакриламид гелінде (*SDS-PAGE*) бөлінді және нитроцеллюлозалық мембранаға (Whatman, Дассель, Германия) электроблоттинг арқылы көшірілді. Нитроцеллюлозалық мембраналар 5% майсызданған сүтте 4 сағ бөлме температурасында өңделді және тиісті антиденелермен, яғни, адамның каспаза 8, каспаза 9, каспаза 3 (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, АҚШ) және бақылау ретінде пайдаланылған винкулинге (1:1000) (Cell Signaling, АҚШ) қарсы біріншілік антиденелермен 4°C температурада түні бойы инкубацияланды. Содан соң, HRP-байланысқан (желкек пероксидазамен конъюгирленген) екіншілік антиденелермен (anti-mouse 1:5000; anti-rabbit 1:3000) (Santa Cruz Biotechnology, АҚШ) 1 сағат бөлме температурасында инкубацияланып, хемилюминесценттік әдіспен *Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus* (Perkin Elmer Life Sciences, Inc., Бостон, АҚШ) реагенттер жиынтығын қолдану арқылы белок жолақтары анықталды. Белок концентрациясы Брэдфорд реагенттер жиынтығын қолдану (Bio-Rad Laboratories, АҚШ) арқылы анықталды.

Қышқыл орта жағдайында жүргізілген зерттеулерде DU145 және PrEC клеткалары тиісті қоректік орталарда 10 күн ішінде өсірілді. RPMI қоректік ортасы 10% FBS және PrEGM қоректік ортасы өндірушінің нұсқаулығына сәйкес гентамицинді қоспағанда барлық қажетті қоспалармен толықтырылды. Ортаның pH мәні HCl көмегімен 7,4 және 6,0 дейін жеткізілді. Клеткалар дикарбон қышқылын тасымалдайтын белоктардың локализацияланған мембрана еріту (солюбилизация) үшін жиналды және өңделді. Біріншіден, клеткалар ($4-5×10^6$) құрамында 100 мкМ сахароза, 10 мМ 3-морфолинпропансульфон қышқылы (*MOPS*) (pH 7,4) және 1 мМ этиленгликоль тетрасірке қышқылы (*EGTA*) бар гипотониялық ерітіндіде 15 минут бойы инкубацияланды. 5 минут 2000 айн / мин жылдамдықпен центрифугалаудан

кейін клеткалар тұнбасы протеаза ингибиторлары бар 1 мл *Ripa* буферінде (Roche, Индианаполис, АҚШ) қайта ресуспензияланды. Клетка суспензиясы үш мұздату-еріту циклімен өңделді және мұзда 30 минут бойы қосымша ерітілді. Лизат 10 минут 14000 айн/мин центрифугадан айналдырылды (үлгілер қыздырылмады) және 12% полиакриламид гелінде ажыратылып, ары қарай нитрозеллюлозды мембранаға көшірілді және тиісті антиденелермен (адамның anti-NADC1, anti-NaDC3 және anti-NaCT; 1:200) өңделді (Santa Cruz Biotechnology, АҚШ). HRP-байланысқан екіншілік антиденелер (anti-goat 1:50000, anti-rabbit 1:3000) (Santa Cruz Biotechnology, АҚШ) химилюминесценция көмегімен анықталды. Белок концентрациясы Брэдфорд реагенттер жиынтығы (Bio-Rad Laboratories, АҚШ) көмегімен анықталды.

2.2.14 Жоғары дәлдікті респирометриялық талдау

Тыныс алу ферменттерінің белсенділігі жоғары кеңейтілімдегі респирометрия арқылы 37°C екі камералы *OROBOROS Oxygraph-2K* респирометрінде (Инсбрук, Австрия) талданды (10-сурет). *OROBOROS DatLab* бағдарламасы деректерді жинау және талдау үшін пайдаланылды. Центрифугалау арқылы жиналған клеткалар ($1x10^6$ клеткалар/мл) түрлендірілген Кребс буферінде (137 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 20 мМ MOPS, pH 7,4 немесе 6,8, 2мМ MgCl2, 1 мМ $KH_2PO_4$, 100 нМ $CaCl_2$ (0,5 мМ және 0,06 мМ $CaCl_2$ 1 мМ EGTA қатысында, pH 7,4 және 6,8 сәйкесінше) шайылып, қайта суспензияланды. EGTA қатысында кальций концентрациясы *Maxchelator* бағдарламасын қолдану арқылы есептелді (http://maxchelator.stanford.edu/CaEGT-ATS.htm). Митохондрияларды зақымдамайтын концентрациясы 100 нМ $CaCl_2$ клеткалардың мембранасын дигитонинмен тесу кезінде сукцинат қатысында оттегі тұтыну қарқынының өсуін көрсетуде пайдаланылды. Сонымен қатар, 0,1, 0,5 және 1 мМ $CaCl_2$ бар pH 6,8, буферлері, сәйкесінше 1 мМ EGTA қатысында 1,1 мМ, 1,5 мМ және 2 мМ $CaCl_2$ дайындалды. Клеткалардың эндогенді энергетикалық қабілетін бағалау үшін, глюкоза да, пируват та өлшеу камерасына қосылмады. Тыныс алу жүйе тұрақтандырылғаннан кейін, клеткаларға мембрананың деполяризациясын тудырмайтын және оттегі тұтынуды белсендіретін FCCP ерітіндісінің 20 немесе 40 нМ мөлшері қосылды. Ары қарай, ең жоғары белсенділік үшін клеткалар 10 мМ сукцинатпен белсендірілді [231, p. 2044-2048; 232, p. 122]. Тыныс алу қарқыны секундына бір миллион клеткаларымен көрсетілді. Содан кейін, митохондрияның максималды сукцинат тотықтырғыш қабілетін бағалау үшін 10 мкМ дигитонин қосылды.

Электрондардың тасымалдану интенсивтілігіне тыныс алуды шектеуші әсерледің табиғатына және тасымалдағыштардың тотықсыздану деңгейіне қатысты митохондриялардың бес метаболиттік жағдайларын бөліп қарайды [136, с. 30-31]:

1. эндогенді тыныс алу - тотығу субстраттары мен АДФ - фосфат акцепторлары болмаған кезде көрінеді;

2. субстратты жағдай - тотығу субстарттарының болуымен, бірақ АДФ болмауымен сипатталады;

3. белсенді фосфорлаушы (энергизацияланған) жағдай тотығу субстраттары мен АДФ болған жағдайда көрінеді, яғни митохондриялардың тыныс алуы жылдам белсендірілген жағдайында болады. Бұл жағдайда тыныс алу қарқындылығы митохондрияларға субстраттардың ену жылдамдығымен және тотыға фосфорлаушы ферменттердің күш-қуаттылығымен шектеледі. Сондай-ақ бұл жағдайда субстраттардың тотығу АДФ-тің фосфорлануымен қатар жүреді;

4. фосфорланбайтын жағдай – қосылған АДФ таусылуымен болатын тыныс алуының бәсеңдеуімен сипатталады және бұл кезде тотығу жылдамдығы АДФ тапшылығымен шектеледі. Бұл жағдайда митохондриялардың оттегіні тұтынуы ішкі мембрана арқылы протондардың ағып кетуімен және электрон тасымалдауының фосфорланбайтын жолының қызмет етуіне байланысты;

5. анаэробты жағдай, яғни электродтың ұяшығында оттегі қоры біткен жағдайында дамиды.




Сурет 10 – Клеткалардың тыныс алу белсенділігін өлшейтін *OROBOROS Oxygraph-2K* респирометрі

2.2.15 Кері транскрипция және полимеразалық тізбекті реакция (ПТР) талдауы

Клеткалардан жалпы РНҚ молекуласы *RNeasy Mini kit* (*Qiagen*, Германия) жиынтығын қолдану арқылы және өндірушінің нұсқаулығына сәйкес бөлініп алынды. Геномдық ДНҚ молекуласымен кез келген ықтимал ластануын болдырмау үшін РНҚ *TurboDNase* жиынтығымен (Ambion (R), Гранд-Айленд, АҚШ) өндірушінің нұсқауына сәйкес өңделді. Бөлініп алынған РНҚ

молекуласының концентрациясы мен сапасы *NanoDrop* спектрофотометрі (NanoDrop Technologies, Уилмингтон, АҚШ) көмегімен анықталды. РНҚ үлгі 50 нг/мкл концентрациясына дейін жеткізілді. Ішкі бақылау ретінде глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (*GAPDH*) пайдаланылды. Кері транскриптазды ПТР (КТ-ПТР) нұсқаулығы жоғары сыйымдылықты кДНҚ молекуласын кері транскриптаза жиынтығын (Applied Biosystem, Гранд-Айленд, АҚШ) және 1 мкг РНҚ үлгіні қолдану арқылы *Eppendorf Mastercycler* (Гамбург, Германия) амплификаторында жүргізілді. кДНҚ синтездеу үшін реакциялық қоспа ең алдымен 25°С температурада 10 минут бойы, содан кейін 37°С температурада 2 сағ бойы инкубацияланды. Кері транскриптаза белсенділігін төмендету үшін қоспа 85°С температурада 5 мин бойы қыздырылды, және *Eppendorf Mastercycler EpigradientS* (Гамбург, Германия) қолдану арқылы ПТР жүргізілді. Амплификация құрамында 5 мкл *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystem, АҚШ), 1 мкл праймерлер қоспасы (олардың әрқайсысы 5 мкМ), 2,75 мкл су және 1,25 мкл кДНҚ молекуласы бар (10 нг/мкл негізгі ерітінді) соңғы көлем 10 мкл болатын реакциялық қоспада жүргізілді. ПТР-да мынадай амплификация бағдарламасы қолданылды: денатурация 95°С 10 мин, содан соң 40 циклдан тұратын 95°С 15 сек, 60°С 1 мин және 72°С 1 мин. ПТР кем дегенде 3 рет қайталанды. ПТР өнімдері электрофорез арқылы 6% полиакриламид гелінде ажыратылды. Гель этидиум бромидпен боялды және нәтижелер *Geldoc* жүйесі (BioRad, АҚШ) арқылы құжатталды. Адамның кДНҚ молекуласы дикарбон тасымалдаушыларын (NaDC1, NaDC3, NaCT) амплификациялау үшін қолданылатын арнайы олигонуклеотидті праймерлер [249, p. 395] әдебиетте келтірілген.

### 2.3 Нәтижелерді статистикалық талдау

Статистикалық талдау *GraphPad Prism* бағдарламасының 5.03 нұсқасын пайдаланып жүргізілді (GraphPad Software компаниясы, Сан-Диего, АҚШ). Зерттеу нәтижелер кем дегенде үш тәуелсіз қайталау негізінде жүргізілді және орташа мәнінің стандарттық қатесі (± SEM) есептелді. Өңделген және өңделмеген клеткалар мәліметтері арасындағы статистикалық маңызды айырмашылықтар жұп емес екі жақты *t*-тест *Стьюдент* көмегімен бағаланды. $p<0,05$ мәнінде айырмашылықтар елеулі болуымен сипатталды.

## 3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ

### 3.1 Қуық асты безі ісік клеткаларының энергетикалық метаболизміне төмен температуралық плазманың әсері

3.1.1 Төмен температуралық плазма дозаларын және олардың тұрақтылығын анықтау

Диэлектрлік тосқауыл разряды (ДТР) құрылғысы үшін плазмалық доза көп жағдайда аудан бірлігіндегі энергия (Дж/см$^2$) түрінде белгіленеді, мұндағы энергия қуат көзімен өндірілетін шығу энергиясы (электродқа кіретін), ал аудан электрод бетінің көлемі болып табылады. Сонымен, плазма күшін (энергиясын) есептеуде келесі формула қолданылды:

$$\text{Вт(Вт/см}^2\text{) x t(сек) = Дж/см}^2 \qquad [20]$$

Бұл тәжірибеде электрод бетінің ауданы 2,54 см тең болатын дөңгелек мыс электроды қолданылды және 2-кестеде «қою қара» түспен белгіленген плазма параметрлері таңдалды.

Кесте 2 – Электрод бетінің ауданына байланысты есептелген плазма параметрлері

| Импульстің ұзақтығы | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Жиілік | | 1 μs | | 2 μs | | **3 μs** | | 4 μs | | 5 μs | | 6 μs | |
| № | Гц | А | Вт | А | Вт | А | Вт | А | Вт | А | Вт | А | Вт |
| 1 | 50 | 17,8 | 1,4 | 19,6 | 2 | 19,8 | 2,1 | 20,8 | 2,2 | 22,2 | 2,6 | 23,8 | 3 |
| **2** | **100** | 18,4 | 1,5 | 20,0 | 2,2 | 21,0 | **2,4** | 21,4 | 2,4 | 22,4 | 2,7 | 24,0 | 3,2 |
| **3** | **250** | 17,6 | 1,4 | 19,4 | 1,9 | 20,8 | **2,2** | 21,0 | 2,4 | 22,8 | 2,9 | 23,8 | 3,7 |
| 4 | 500 | 17,4 | 1,4 | 19,6 | 2 | 19,8 | 2,2 | 21,0 | 2 | 22,2 | 3,2 | 25,0 | 4,1 |
| 5 | 1000 | 18,0 | 1,4 | 19,8 | 2,2 | 20,4 | 2,3 | 21,2 | 2,6 | 21,8 | 3 | 24,6 | 4,2 |
| 6 | 1500 | 17,6 | 1,3 | 20,0 | 2,1 | 20,4 | 2,3 | 21,4 | 2,5 | 22,0 | 3 | 24,8 | 4,2 |
| 7 | 2000 | 17,4 | 2,5 | 20,2 | 5,3 | 20,8 | 5,6 | 21,6 | 6 | 22,8 | 7 | 24,4 | 7,8 |
| 8 | 2500 | 18,0 | 2,5 | 19,8 | 5,2 | 20,2 | 5,4 | 21,8 | 6 | 22,6 | 7,3 | 24,8 | 8,7 |
| 9 | 3000 | 17,6 | 2,9 | 20,4 | 5,3 | 20,4 | 5,5 | 21,0 | 5,8 | 22,4 | 7,1 | 25,0 | 9 |
| 10 | 3500 | 18,2 | 3,7 | 19,8 | 5 | 20,8 | 5,4 | 21,4 | 5,6 | 22,8 | 7,3 | 24,8 | 9,4 |
| *Ескертпе – Гц - жиілік; А - амплитуда; Вт - қуат; μs - микросекунд | | | | | | | | | | | | | |

Сонымен, жоғарыда келтірілген формула бойынша 7 түрлі плазманың энергиясы анықталды:

Д1 2:3 → (100 Гц:2,4 Вт) → 2,4/5,08 = 0,47 Вт/см$^2$ → 0,47 Вт/см$^2$ x 5 сек = 2,37 Дж/см$^2$;

Д2 2:3 → (100 Гц:2,4 Вт) → 2,4/5,08 = 0,47 Вт/см$^2$ → 0,47 Вт/см$^2$ x 10 сек = 4,7 Дж/см$^2$;

Д3 2:3 → (100 Гц:2,4 Вт) → 2,4/5,08 = 0,47 Вт/см$^2$ → 0,47 Вт/см$^2$ x 15 сек = 7,05 Дж/см$^2$;

Д4 2:3 → (100 Гц:2,4 Вт) → 2,4/5,08 = 0,47 Вт/см$^2$ → 0,47 Вт/см$^2$ x 20 сек = 9,4 Дж/см$^2$;

Д5 2:3 → (100 Гц:2,4 Вт) → 2,4/5,08 = 0,47 Вт/см$^2$ → 0,47 Вт/см$^2$ х 30 сек = 14,1 Дж/см$^2$;

Д6 3:3 → (250 Гц:2,2 Вт) → 2,2/5,08 = 0,43 Вт/см$^2$ → 0,43 Вт/см$^2$ х 20 сек = 8,6 Дж/см$^2$;

Д7 3:3 → (250 Гц:2,2 Вт) → 2,2/5,08 = 0,43 Вт/см$^2$ → 0,43 Вт/см$^2$ х 30 сек = 12,9 Дж/см$^2$.

Бұл анықтама көптеген қолданыста пайдалы болғанымен, ол ортаға дейін жеткізілетін плазмалық энергияны өлшейтін нақты параметр болып табылмайды. Зерттеуді жүзеге асыру үшін Д1-Д7 плазмалық дозаларды 1,5 мл Эппендорф пробиркада 0,5 см pH электрод ұшын қолдана отырып, 1 мл деионизацияланған судың pH мәнінің ығысуы арқылы (өзгеруі бойынша) нақты бір жиілік/қуат қатынасында және уақыт ұзақтығында плазманы қолдану арқылы сипаттау анғұрлым тиімді болды. Эппендорф пробиркасының 1 см диаметрге тарылған ашылу тесігі су бетінің атмосфералық $CO_2$ (судың pH буферизациялай алатын) байланысын азайтуға мүмкіндік береді.

Көптеген ғалымдар [28, p. 2; 106, p. 171; 264, 265] плазмамен өңделген сұйықтықтардың pH мәні өзгеретіні жайында айтқан. Осы тәжірибелік жағдайда төмен температуралық плазмамен өңделген деионизацияланған судың pH мәнінің өзгеруіне карай плазманың әртүрлі дозалары анықталды. Берілген доза мен өңдеу уақытынан кейін деионизацияланған судың pH мәні 5,4±0,13 (Д1) пен 3,2±0,05 (Д7) аралығында ауытқыды, яғни плазманың дозалық мөлшері артқан сайын pH мәні төмендеді (Д2 - 4,9±0,11; Д3 - 4,5±0,13; Д4 - 4,1±0,11; Д5 - 3,9±0,14; Д6 - 3,7±0,14 ), ал бақылау ретінде алынған плазмамен өңделмеген деионизацияланған судың pH мәні 6,4±0,13 болды (11-сурет). Сонымен, плазма дозалары түрлі жиілік/қуат және өңдеу уақыты қатынасында деионизацияланған судың pH мәнінің өзгеруі бойынша анықталып алынды. Неғұрлым судың қышқылдығы артқан сайын, соғұрлым плазма дозасының мөлшері жоғары болды.

Плазмамен өңделген сұйықтықтар, соның ішінде деионизацияланған су, PBS және NAC ерітінділері арқылы жанама плазманы қолдану түрлі мақсаттар үшін бағаланды [255, p. 547].

Сонымен қатар, төмен температуралық плазмамен өңделген PBS құрамында $Ca^{2+}$ және $Mg^{2+}$ жоқ күйде pH көрсеткішін өлшеу арқылы плазманың тұрақтылығы 1 тәулік бойы, яғни 30 мин, 1, 4, 8 және 24 сағ кейін анықталды. 3-кестеден плазма дозалары өзінің әсер ету қасиетін 24 сағ бойы жоймайтындығын көруге болады. Мұнда, плазмамен өңделмеген PBS бастапқы pH 7,4 болды. Ал Д2 плазма дозасымен (100 Гц, 2,4 Вт, 10 сек) өңделген PBS 30 мин, 1, 4, 8 және 24 сағ кейінгі орташа pH мәні 7,20±0,01, Д5 плазма дозасымен (100 Гц, 2,4 Вт, 30 сек) өңделген PBS орташа pH мәні 7,07±0,02 және Д7 плазма дозасымен (250 Гц, 2,2 Вт, 30 сек) өңделген PBS орташа pH мәні 6,82±0,03 сақтады. Сондай-ақ барлығында орташа температура 21,5±0,03ºC болды, яғни pH мәні мен температураның айтарлықтай өзгермегені байқалды (стандарттық ауытқу ±0,03, бұл нәтижелер 5 тәуелсіз жасалған тәжірибелерден алынып

ұсынылды және әр бір тәжірибе 3 қайталаудан тұрды). Сонымен, бұл көрсетілген тәжірибе плазманың тұрақтылығын дәлелдейді [265, б. 89-90].




Келтірілген мәндер орташа (±SD) есеппен алынды (n=5).

Сурет 11 – Төмен температуралық плазма дозаларын бидистилденген судың pH мәнінің өзгеруіне қарай анықтау

Кесте 3 – Төмен температуралық плазманың тұрақтылығын 24 сағат бойы анықтау

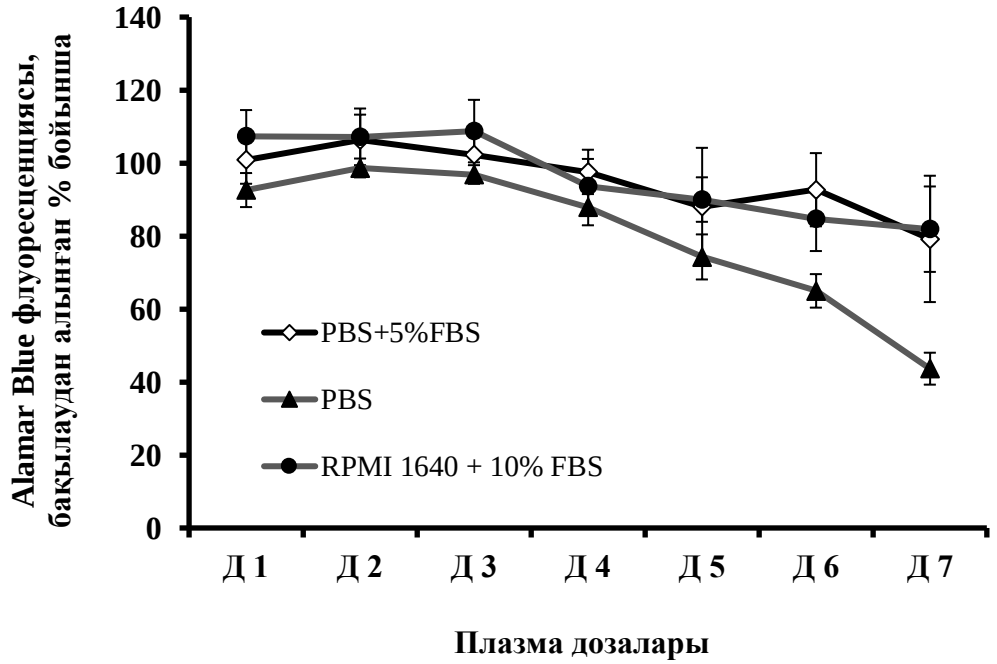
| Плазма дозасы / Уақыт | Д 2 (100 Гц, 2,4 Вт, 10 сек) | | Д 5 (100 Гц, 2,4 Вт, 30 сек) | | Д 7 (250 Гц, 2,2 Вт, 30 сек) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | pH | t°C | pH | t°C | pH | t°C |
| 30 мин | 7,19±0,01 | 21,6±0,05 | 7,07±0,03 | 21,8±0,04 | 6,79±0,04 | 21,7±0,04 |
| 1 сағ | 7,20±0,01 | 21,4±0,04 | 7,06±0,3 | 21,6±0,03 | 6,88±0,03 | 21,2±0,02 |
| 4 сағ | 7,22±0,02 | 21,3±0,03 | 7,07±0,02 | 21,3±0,02 | 6,83±0,03 | 21,3±0,02 |
| 8 сағ | 7,20±0,01 | 21,3±0,03 | 7,08±0,02 | 21,4±0,03 | 6,84±0,02 | 21,4±0,03 |
| 24 сағ | 7,19±0,02 | 21,4±0,03 | 7,07±0,02 | 21,6±0,03 | 6,80±0,03 | 21,7±0,06 |

Сонымен, бұл тәжірибелердің негізінде төмен температуралық плазманың 7 түрлі дозасы анықталды және бұл плазма дозаларының pH мәні 24 сағ бойы тұрақты жағдайда болатыны дәлелденді. Демек, бұл зерттеуден төмен

температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің pH мәні уақытқа тәуелсіз болатынын және оның қасиеті сақталатынын түсінеміз.

3.1.2 Төмен температуралық плазмамен өңделген әртүрлі ерітінділердің клеткаларға цитотоксикалық әсерін анықтау

Төмен температуралық плазманың клеткаларға цитотоксикалық әсері 3 түрлі ерітіндіде бағаланды: құрамында $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ жоқ PBS, PBS + 5% FBS (бұзау ұрығының сарысуы) және RPMI 1640 (қоректік орта) + 10% FBS *Alamar Blue* талдауы арқылы. 12-суретте осы аталған ерітінділерде 1 минут бойы өңделген плазманың қуық асты безі DU145 ісік клеткаларының тіршілік қабілетіне 24 сағаттан кейінгі әсері көрсетілген [265, б. 91].




Келтірілген мәндер орташа есеппен алынды ±SD (n=5).

Сурет 12 – Төмен температуралық плазмамен өңделген ерітінділердің қуық асты безі DU145 ісік клеткаларына 24 сағ кейінгі әсерінің салыстырмалы көрсеткіші

PBS ерітіндісінде өңделген плазманың PBS + 5% FBS және RPMI 1640 + 10% FBS ерітінділерінде өңделген плазмамен салыстырғанда DU145 клеткаларына цитотоксикалық әсері айтарлықтай жоғары болды. Сол себепті, бұл жұмыста PBS өңделген плазма ерітіндісі қолданылды. Сонымен қатар, PBS клиникада қолданылуы үшін Тағам өнімдері мен дәрілік препараттардың сапасын бақылайтын басқару мекемесі (ағыл. Food and Drug Administration, FDA) мақұлдаған және физиологиялық ерітіндіге (0,9% натрий хлор ерітіндісі) ұқсас ерітіндісі болғандықтан, келесі жұмыстарда осы PBS ерітіндісін қолдану ұйғарылды. FBS сарысуы мен RPMI-1640 қоректік орта құрамындағы органикалық заттар плазманың түзілуіне, яғни плазмадағы бос радикалдардың

түзілуіне кедергі жасайтындықтан, бұл ерітінділерде өңделген плазманың клеткаларға әсері әлде қайда төмен болды [266-268].

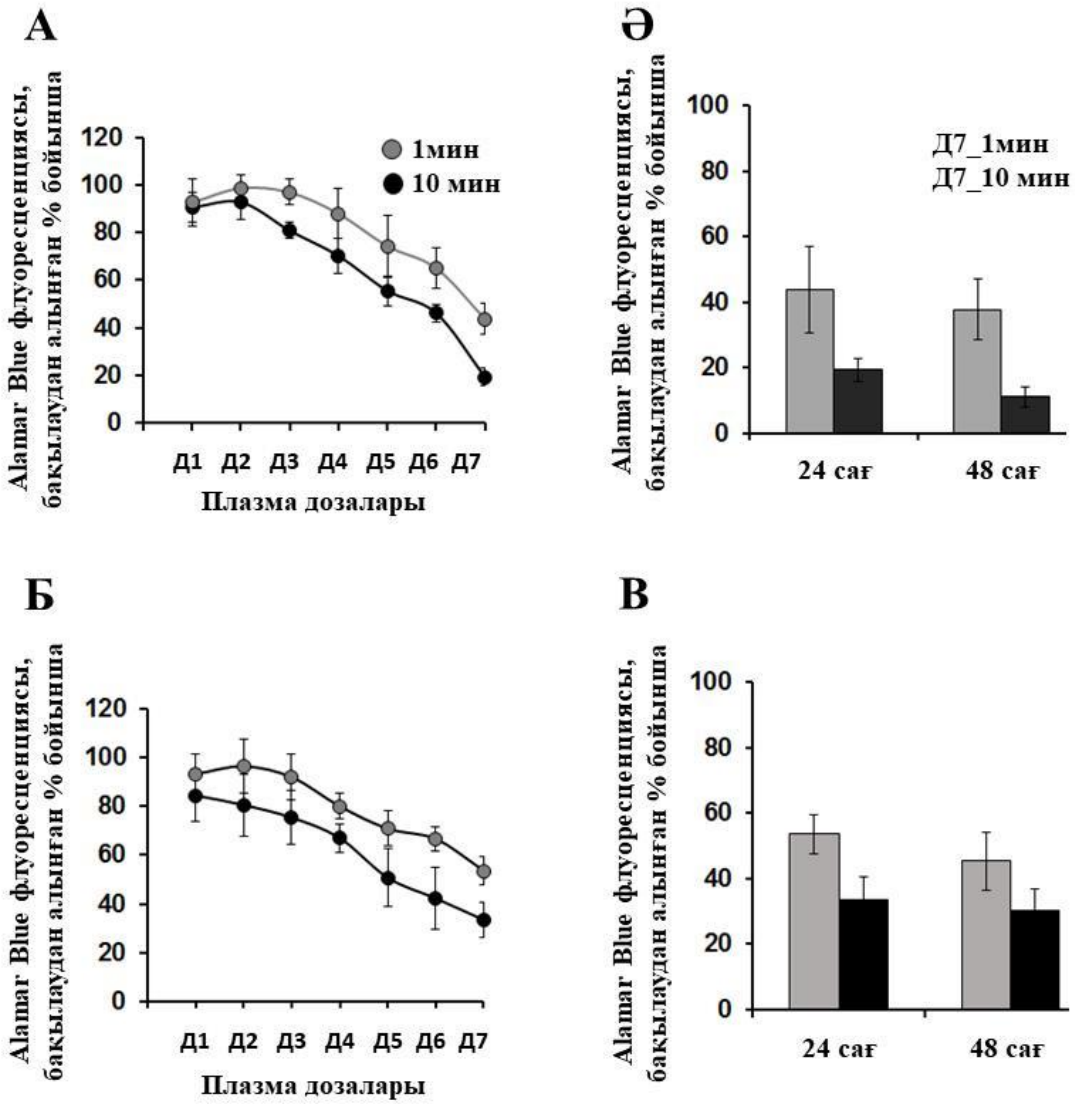
3.1.3 Төмен температуралық плазманың қуық асты безінің қалыпты PrEC және ісік DU145 клеткаларына цитотоксикалық әсері

Клеткаларға төмен температуралық плазманың цитотоксикалық әсері *Alamar Blue* талдауы арқылы 24 және 48 сағ кейін анықталды. Клеткалардың моноқабаты зерттеу материалдары мен әдістері бөлімінде сипатталғандай дәстүрлі жүйе арқылы өндірілген плазмамен өңделген PBS ерітіндісімен өңделді. 13А және 13Б суретте көрсетілгендей, Д1-Д7 плазма дозаларының біртіндеп арттырылған токсикалық әсері анықталды. Төмен температуралық плазманы қолданғанда клеткалардың тіршілік қабілетінің төмендеуі 24 сағ кейін байқалды, нәтижесінде Д7 күшті дозалардың бірі болып табылды. Сондықтан, осы зерттеуде тек Д7 дозасы ғана қолданылды. Доза үлгілерінің тиімділігін түрлендіру арқылы клеткаларды 1 және 10 минут бойы плазмамен ииндукцияланған PBS-ті жаңа клеткалық қоректік ортамен сұйылтып отрып өңделді. Клеткаларды 1 және 10 мин өңдеуден кейін қоректік өсу ортамен сұйылтылған плазмамен өңделген PBS ерітіндісімен шайып тастауы, клеткаларға плазмамен индукцияланған жойқын әсерлерінің дамуын жоятынын атап өту маңызды. Сондықтан, елеулі цитотоксикалық әсерлерге жету үшін тұрақты (константа), бірақ айтарлықтай сұйылтылған плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің бір мезеттікте болмауы (әрбір 0,2 x$10^6$ клеткалар үшін плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің 6 есе көлемі қосылды) аса маңызды болып табылады. Плазмамен индукцияланған PBS дозаларының цитотоксикалық әсер ету деңгейі DU145 ісік клеткалармен салыстырғанда қалыпты PrEC клеткаларда шамамен 20%-ға төмен болды (13А- және 13Б-суреттер). 13Ә-, 13В-суреттердегі сандық графиктер сәйкесінше қуық асты безінің ісік және қалыпты клеткалары үшін де 24 және 48 сағат бойы плазмамен индукцияланған цитотоксикалық әсерінің ұлғайғанын көрсетеді. 1 мин бойы Д7 плазмалық өңдеуден кейін клеткалардың тіршілік қабілеті уақыт өте келе бәсеңдеді, яғни 24 және 48 сағат инкубациядан кейін DU145 ісік клеткаларында мәндер тиісінше 45% және 38%, ал PrEC қалыпты клеткаларында тиісінше 53% және 44% тең болды. Сонымен қатар, 10 мин бойы Д7 плазмалық өңдеу кезінде клеткалардың тіршілік қабілеті 24 және 48 сағ кейін DU145 ісік клеткалары мен PrEC қалыпты клеткаларда сәйкесінше 19% және 10% бен 33% және 30% болды (13Ә- және 13В-суреттер). Бұл көрсеткіштер плазмамен индукцияланған цитотоксикалық дәрежесі плазманың дозасына, әсер ету уақытына және клетка түріне байланысты болатынын дәлелдейді [269-271].

Ары қарай, клетка пролиферациясының қызметіне плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің әсері бағаланды. Ол үшін қалыпты PrEC клеткалары 30000 клетка/ұяшықта, ал DU145 клеткалары 20000 клетка/ұяшықта алынып, 6-ұяшықты планшетке егілді және 10-14 сағ бойы өсірілді. Осы клеткалар Д7 үлгісімен жанама күйде 1 және 10 минут өңделіп, 2 және 6 күн бойы өсірілді

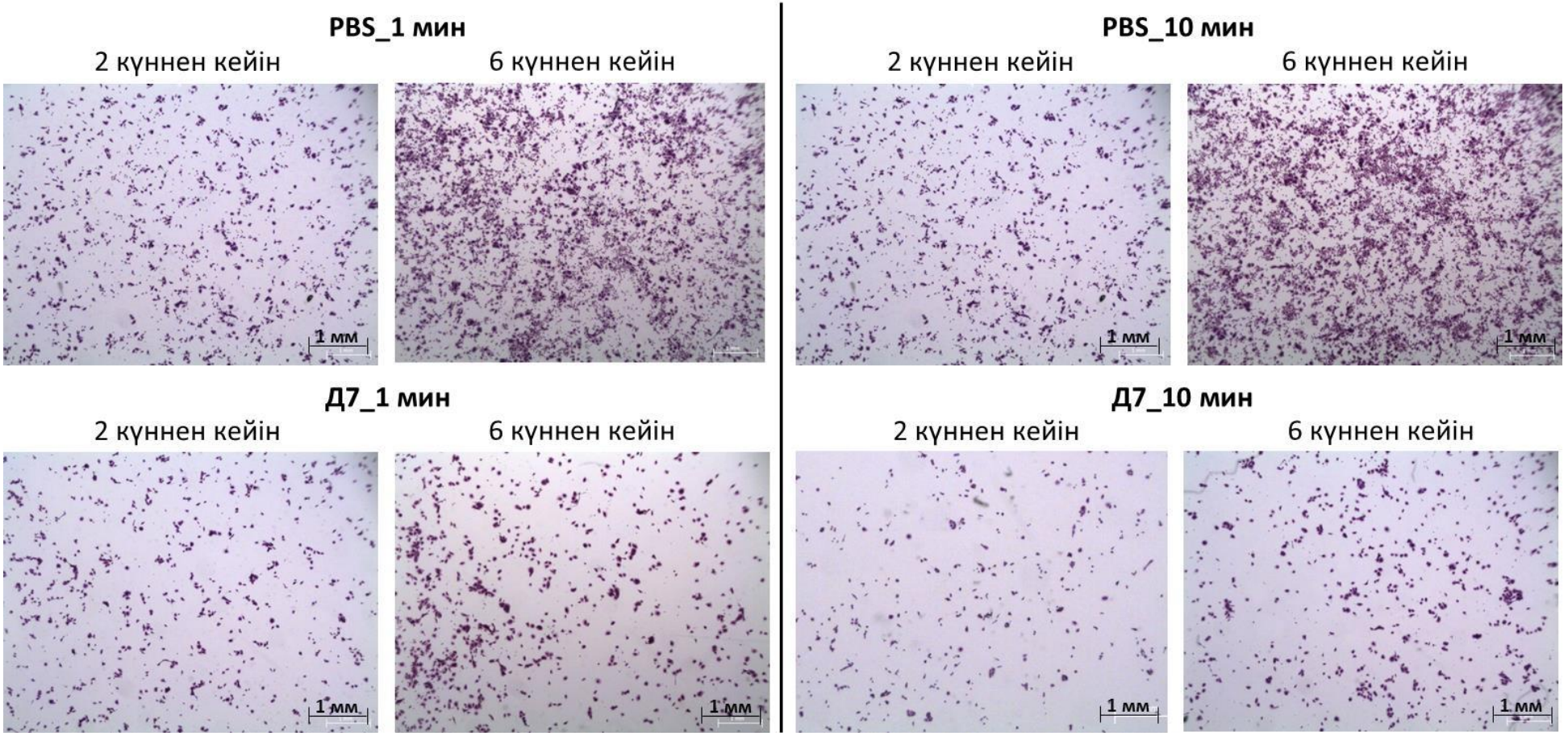
және 0,05% кристалды күлгін бояуымен боялып, алынған нәтижелер Leica MZ16F стереомикроскопында анықталды (14- және 15-суреттер).

Д7 үлгісімен жанама 1 және 10 минут өңделіп, 6 күн бойы өсірілген қуық асты безінің қалыпты PrEC клеткалары өздерінің пролиферативтік активтілігін сақтады. Алайда алғашқыда олар плазмамен туындаған стреске сезімтал болды (16Ә-сурет). Д7 плазма дозасымен өңделген қуық асты безінің қатерлі ісік клеткалары колониялар құру мүмкіндігін жоғалтты (16А-сурет). 10 минуттық өңдеу ісік клеткаларының өліміне ықпал етті. Зерттеулер тәуелсіз 9 тәжірибе нәтижелерінің орташа мәндерін біріктіреді.



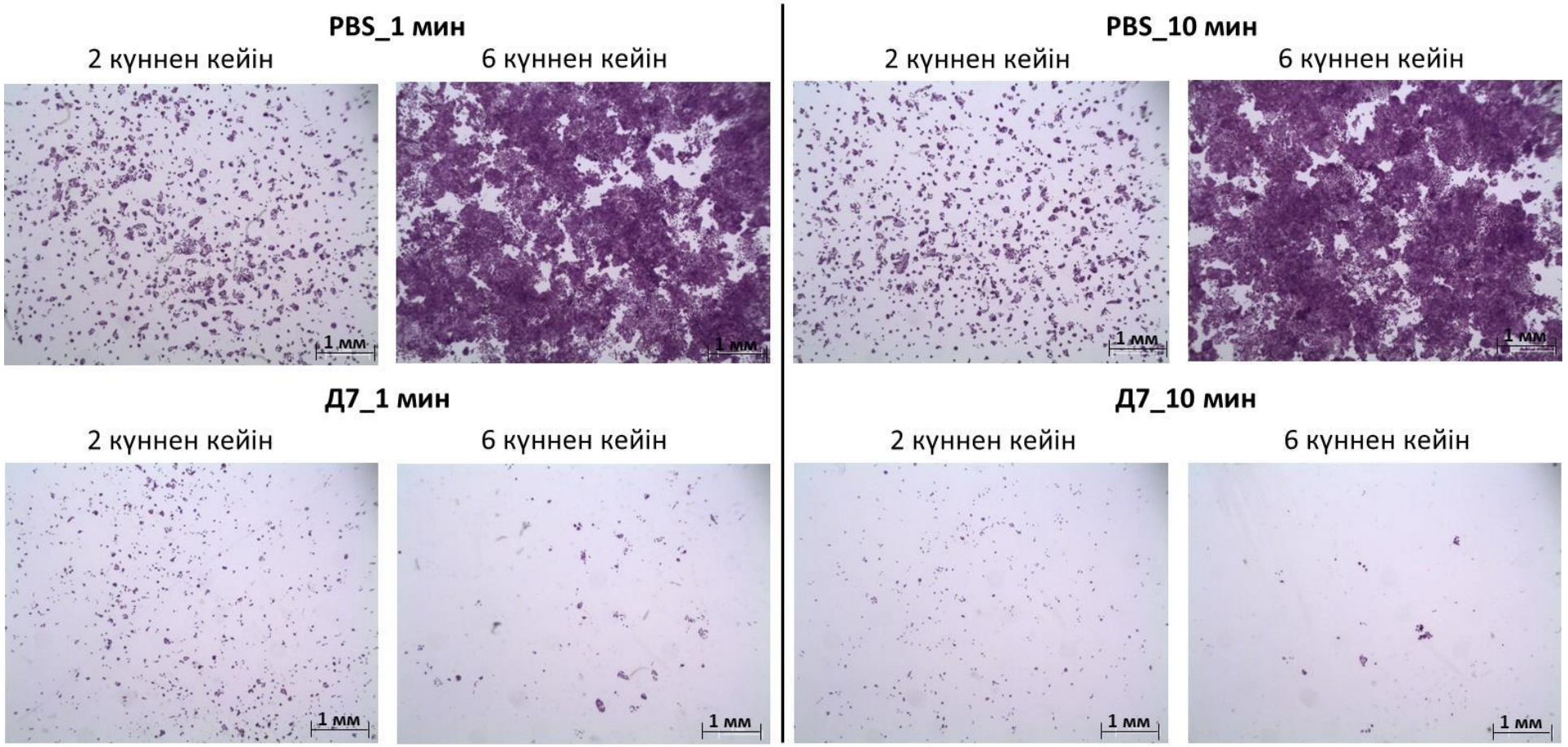

Нәтижелер орташа мәнде ± SEM (орташа мәннің стандарттық қатесі) ретінде ұсынылды (n = 9).

Сурет 13 – Төмен температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің қуық асты безінің DU145 ісік (А, Ә) және PrEC қалыпты (Б, В) клеткаларына цитотоксикалық әсері



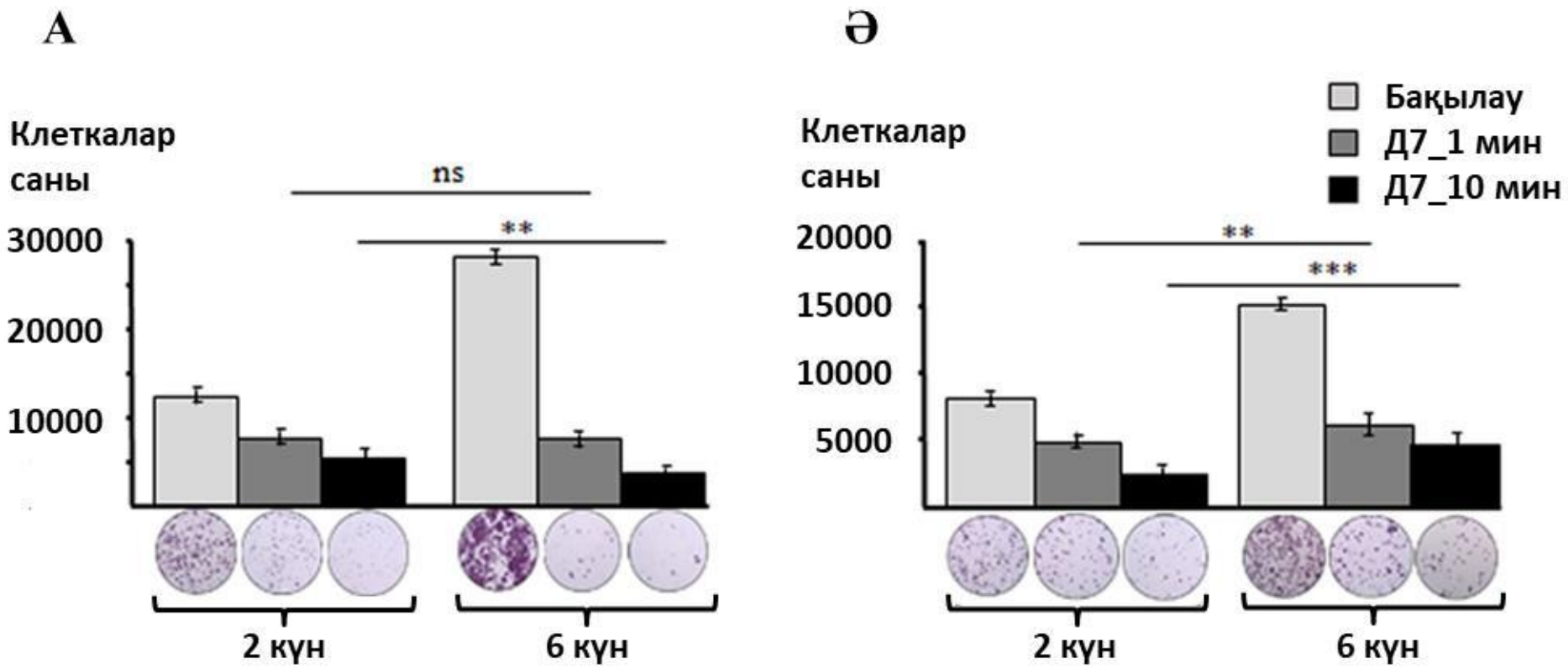

Клеткалар (30000 клетка/ұяшықта) 0,05% кристалды күлгін бояуымен боялып, *Leica MZ16F* стереомикроскопында анықталған.

Сурет 14 – PrEC клеткаларының PBS және Д7 плазма әсерінен кейінгі колониялар түзу нәтижелері




Клеткалар (20000 клетка/ұяшықта) 0,05% кристалды күлгін бояуымен боялып, *Leica MZ16F* стереомикроскопында анықталған.

Сурет 15 – DU145 клеткаларының PBS және Д7 плазма әсерінен кейінгі колониялар түзу нәтижелері




Мәндер үш тәуелсіз тәжірибелерден орташа мәннің стандарттық қатесі (± SEM) ретінде ұсынылды. $^{**}P<0,01$, $^{***}P<0,001$, ns – айтарлықтай емес.

Сурет 16 – Қуық асты безінің DU145 ісік (А) және PrEC қалыпты (Ә) клеткаларының колония түзу нәтижелерінің диаграммасы

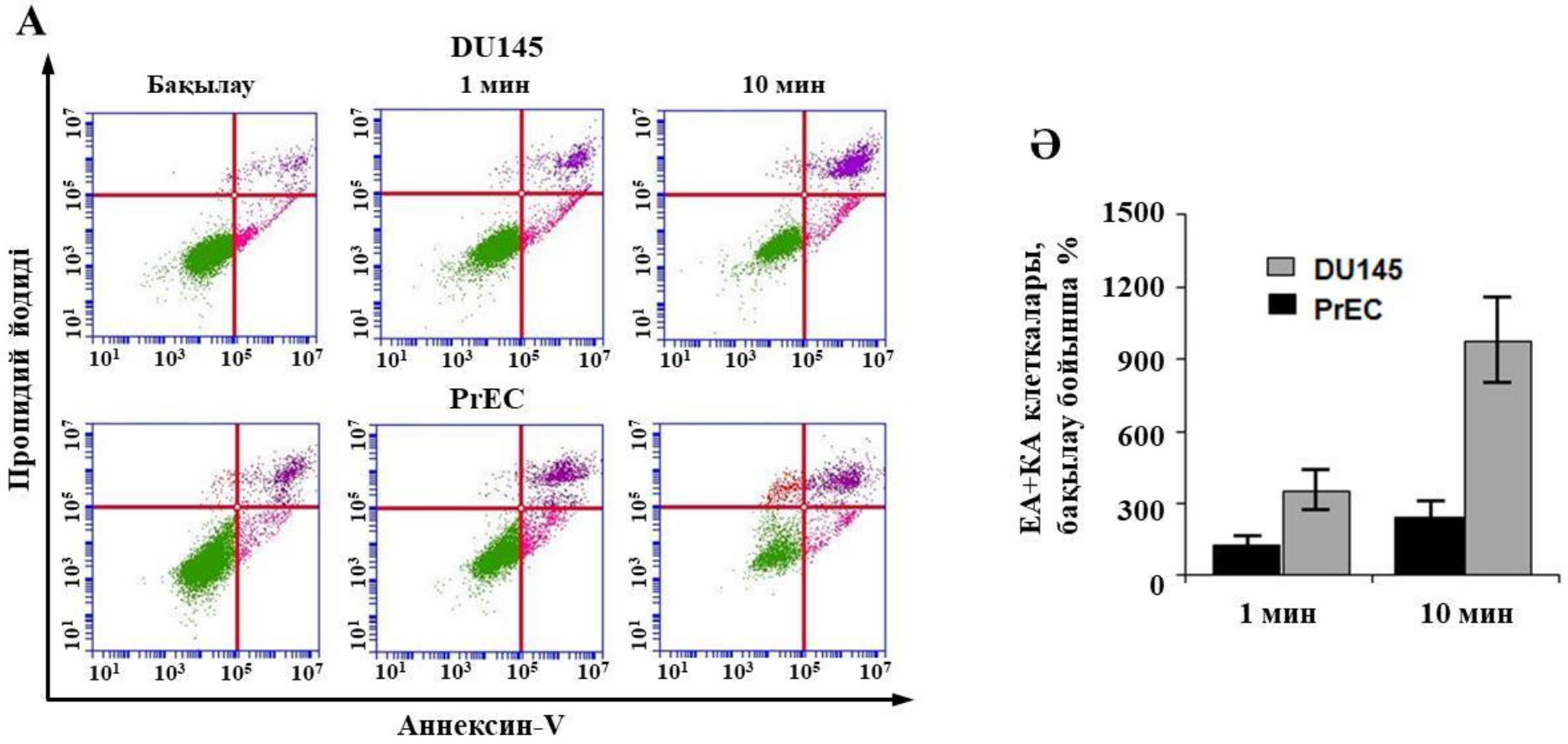
Салыстырмалы түрде 1 минуттық экспозицияға қарағанда 10 минуттық экспозиция (14-, 15- және 16-суреттер) клеткалардың колония қалыптастыру қабілеттілігін анағұрлым күшті тежейтіні байқалды. Қатерлі ісік клеткаларына қарағанда, қалыпты PrEC клеткалары Д7 плазманың 1 минуттық және 10 минуттық өңдеуінен кейін өздерінің колония құру қызметін қалпына келтіру процесін көрсетті (14-, 16Ә-суреттер).

Сонымен, қалыпты клеткалар қатерлі ісік клеткалары сияқты плазманың зақымдайтын әсерлеріне сезімтал болатынына қарамастан, уақыт өте келе олардың қайта қалыпқа келуін және пролиферациялануын анық көрсетті.

3.1.4 Төмен температуралық плазманың клеткалардағы апоптоз процесіне әсері

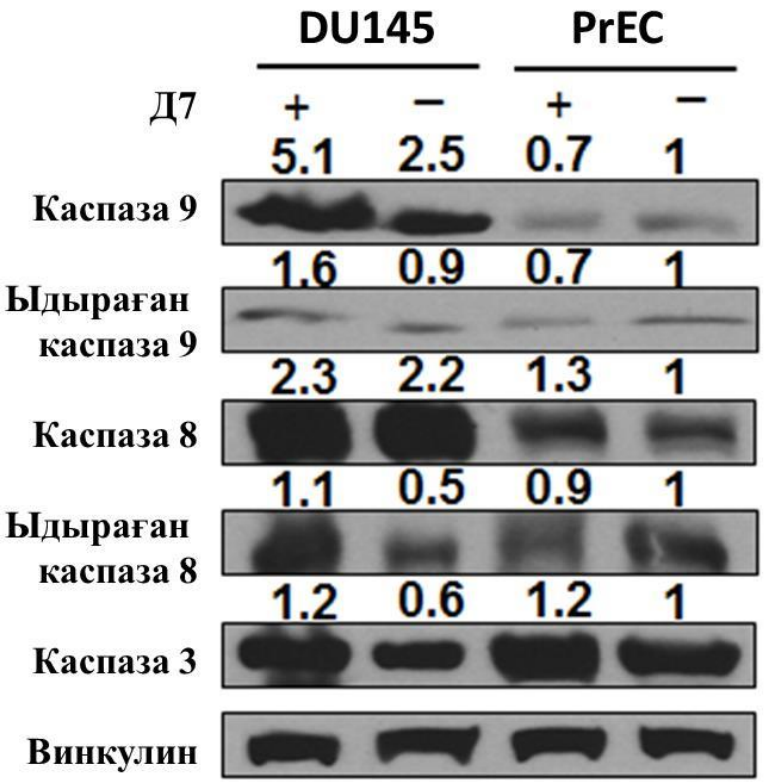
Клеткалардағы апоптоз процесінің индукциясы ағынды цитометр *BD Accuri C6* мен *Alexa Fluor 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit* жиынтығын қолдану арқылы төмен температуралы плазмалық өңдеуден кейін 24 сағат өткеннен соң анықталды. Д7 плазманың қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткаларында апоптоз процесін индукциялайтыны көрсетілді (17-сурет). 17А суретте DU145 және PrEC клеткаларында апоптоз процесінің даму мәліметтері сипатталған. Клеткалар Д7 плазмасымен 1 және 10 минут бойы өңделді, келесі ретте оларды одан әрі сақтау үшін жаңа қоректік орта қосылды. PrEC клеткаларды Д7 плазмасымен 10 минуттық өңдеу 1 минуттық өңделген клеткалармен салыстырғанда 143±7,5% көрсеткіштен 257±23% дейін жетіп, айқын клеткалық апоптоздық әсерін көрсетті. Алайда, қалыпты клеткаларға қарағанда DU145 метастатикалық ісік клеткалары 10 минут плазмалық өңдеуге жоғары сезімталдылығымен ерекшеленді. Кейінгі (кеш) апоптоз 1 минуттық өңделген ісік клеткаларда 335±71,4% болса, ал 10 минут бойы өңделген клеткаларда 981±181% болатыны байқалды (17Ә-сурет) [269, б. 24-25; 283, p. 5-6; 272].

Плазмалық өңдеуден кейін 24 сағат өткеннен соң Вестерн-блот талдауы жүргізілді (18-сурет). Вестерн-блот әдісі көмегімен DU145 ісік клеткалардың апоптоз процесін талдау бұл клеткалардығы апоптоз процесінің ішкі және сыртқы жолдармен жүретінін көрсетеді. Бұл плазмалық өңдеуден кейін клеткаларда каспаза 9 және каспаза 8 белоктарының көп мөлшерде болатынын айғайтайды. Алайда, қалыпты клеткаларды төмен температуралық плазмамен өңдегеннен кейін электрофорез арқылы талдау жасағанда, каспаза 8 белогының жолақтары айқын болып көрінетіні анықталды, ал бұл апоптоз процесінің митохондриядан тыс каскадтың көмегімен дамитынын білдіреді. Ішкі бақылау ретінде винкулин цитоқаңқа белогы пайдаланылды. Әр белок жолағы үшін салыстырмалы арақатынасты есептеу, плазмалық өңдеуден өтпеген PrEC клеткалар белоктарының экспрессиясының мәні 1 санымен белгіленді.




А. DU145 және PrEC клеткаларында ағынды цитометриямен алынған апоптоз процесінің даму мәліметтері. Ә. Ерте және кеш апоптоздық клеткалардың (ЕА+КА) сандық мәліметтері. Нәтижелер орташа мәнде ± SEM (орташа мәннің стандарттық қатесі) ретінде ұсынылды (n = 9).

Сурет 17 – Қуық асты безінің DU145 ісік және PrEC қалыпты клеткаларының төмен температуралық плазмамен индукцияланған апоптоз процесі

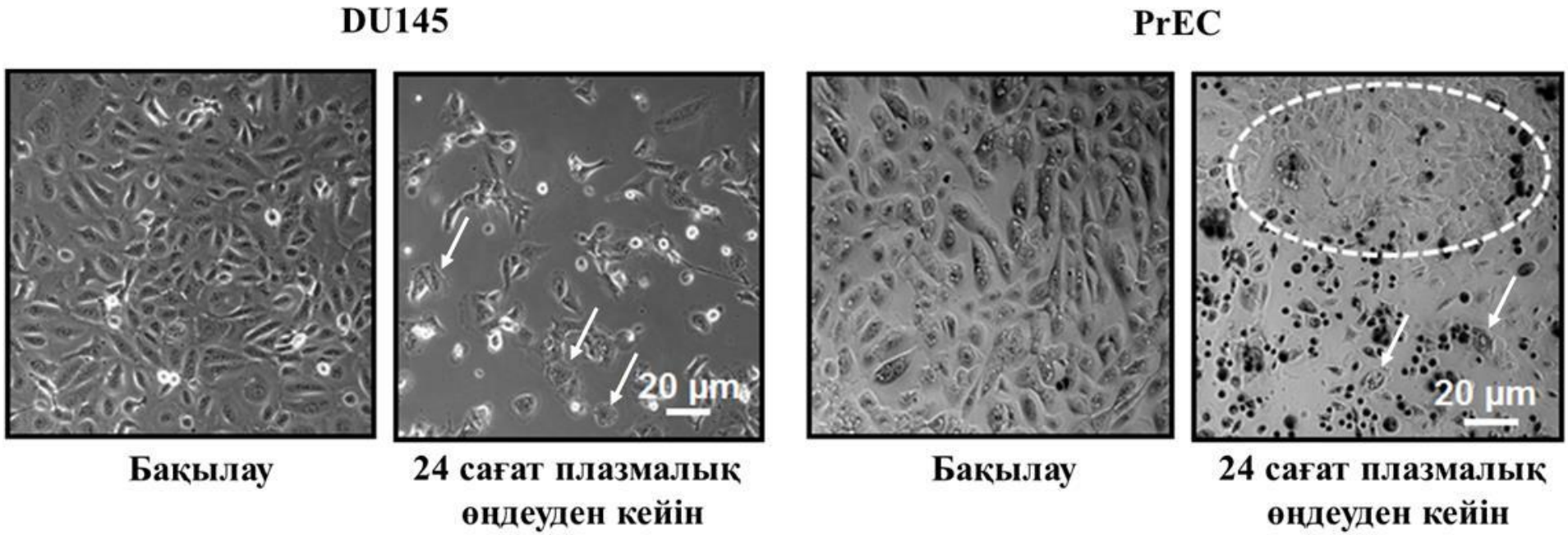



Винкулин ішкі бақылау ретінде пайдаланылды. Әрбір белок жолағының салыстырмалы арақатынасты көрсету үшін, плазмамен өңделмеген PrEC клеткалардағы белоктарының мәні 1 санымен белгіленді.

Сурет 18 – Төмен температуралық плазманың қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткаларында каспазаға тәуелді апоптоз процесін индукциялауы

Сонымен, клеткалардың митохондриялары мен цитозолдарынан босап шыққан каспаза 8 және каспаза 9 соңында каспаза 3-ті белсендіріп, нәтижесінде плазма әсерінен қуық асты безі ісік клеткаларының апоптоз процесі каспазаға тәуелді механизмдері арқылы дамитыны анықталды.

Келесі ретте DU145 ісік және PrEC қалыпты клеткаларының саны мен морфологиялық құрылымына 24 сағаттан кейінгі төмен температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің әсері келтірілген (19-сурет). 24 сағаттық плазмалық өңдеуден кейін клеткалардың екі типінде де сыртқы бетінде көпіршіктер мен морфологиясында өзгерістерді байқауға болады (19-суретте көрсеткіш арқылы белгіленген), яғни плазмамен өңделген клеткалардың бастапқы пішіні өзгерген, шекаралары тегіс емес және оқшауланған адгезиялары көрінді. Морфологиясы өзгерген және қоректік ортадағы денешіктер апоптоздың белгісін көрсетті. Плазмалық индукциядан кейін 24 сағат өткеннен соң PrEC қалыпты клеткалардың пішіні ісік клеткаларымен DU145 салыстырғанда бастапқы қалпына келуі жоғары болды. Плазмалық өңдеуден кейін тірі қалған клеткалардың сыртқы беті тегістеліп, қайта көбеюге қабілеттілігін көрсетті.




Ақ шеңбер плазмалық өңдеуден кейін тірі қалған PrEC клеткалардың аймағын көрсетеді. Суреттегі көрсеткіш белгілері морфологиялық құрылымы өзгерген және сыртқы беткейі көпіршіктенген клеткаларды көрсетеді.

Сурет 19 – Төмен температуралық плазманың қуық асты безінің қалыпты PrEC және ісік DU145 клеткаларының морфологиялық құрылымына әсер

Тринокулярлық (40 х) микроскоптың көмегімен алынған нәтижелер бір-біріне тәуелсіз 5 қайталаудан кейін алынды.

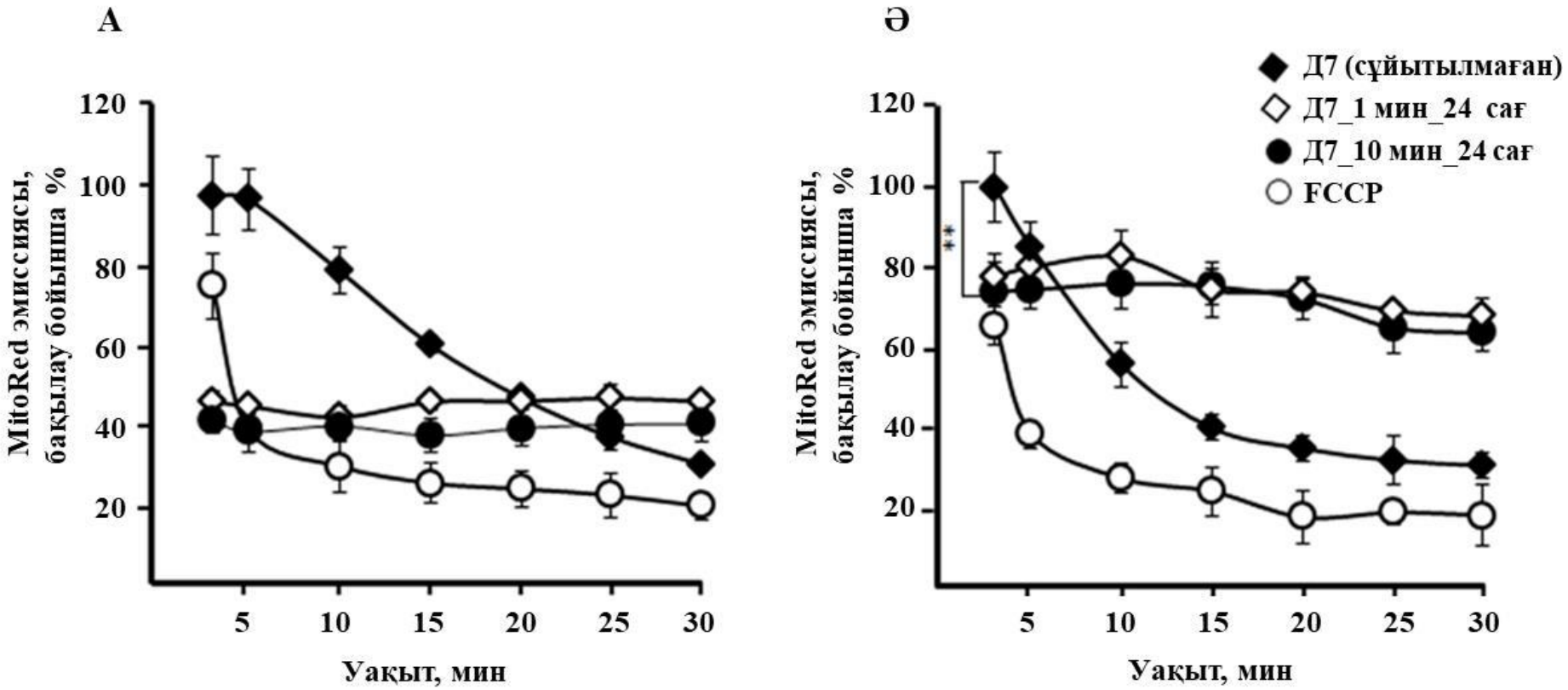
Сонымен, осы алынған нәтижелер негізінде төмен температуралық плазма әсерінен қуық асты безі ісігі клеткаларында апоптоз процесінің туындауы каспаза белоктарына тәуелді болатыны дәлелденді.

### 3.1.5 Митохондриядағы энергетикалық метаболизмнің төмен температуралық плазмамен индукцияланған өзгерістері

Бұл зерттеу жұмысында плазмамен индукцияланған клетка гомеостазындағы өзгерістерде митохондриялардың рөлін анықтау басты мәселе ретінде қарастырылды. Митохондрия бұл клеткалардың энергия қажеттілігіне орай АҮФ қышқылын синтездеу және сигнал беру мен стреске жауап үшін оттегінің белсенді түрлерін (ОБТ) өндіруде негізгі көз болып табылатыны белгілі. Зерттеуде митохондрияның ішкі мембраналық потенциалына ($\Delta\psi m$) плазмамен өңдеудің әсері бағаланды. Клеткалардағы митохондриялардың мембраналық потенциалы *MitoRed* (75 нМ) флуоресцентті бояуымен таңбалану арқылы анықталды. Клеткалар *MitoRed* бояуымен плазмамен өңделген PBS ерітіндісін қосу алдында немесе 1 және 10 минут бойы Д7 плазмасымен 24 сағаттық өңдеуден кейін таңбаланды. Оң бақылау ретінде клетка мембранасының толық деполяризациясына әкелетін және митохондрияның тотыға фосфорлануын ажырататын 2 мкМ карбонилцианид 4-(трифторметокси) фенилгидразонның (FCCP) дозасымен өңделген үлгі қолданылды.

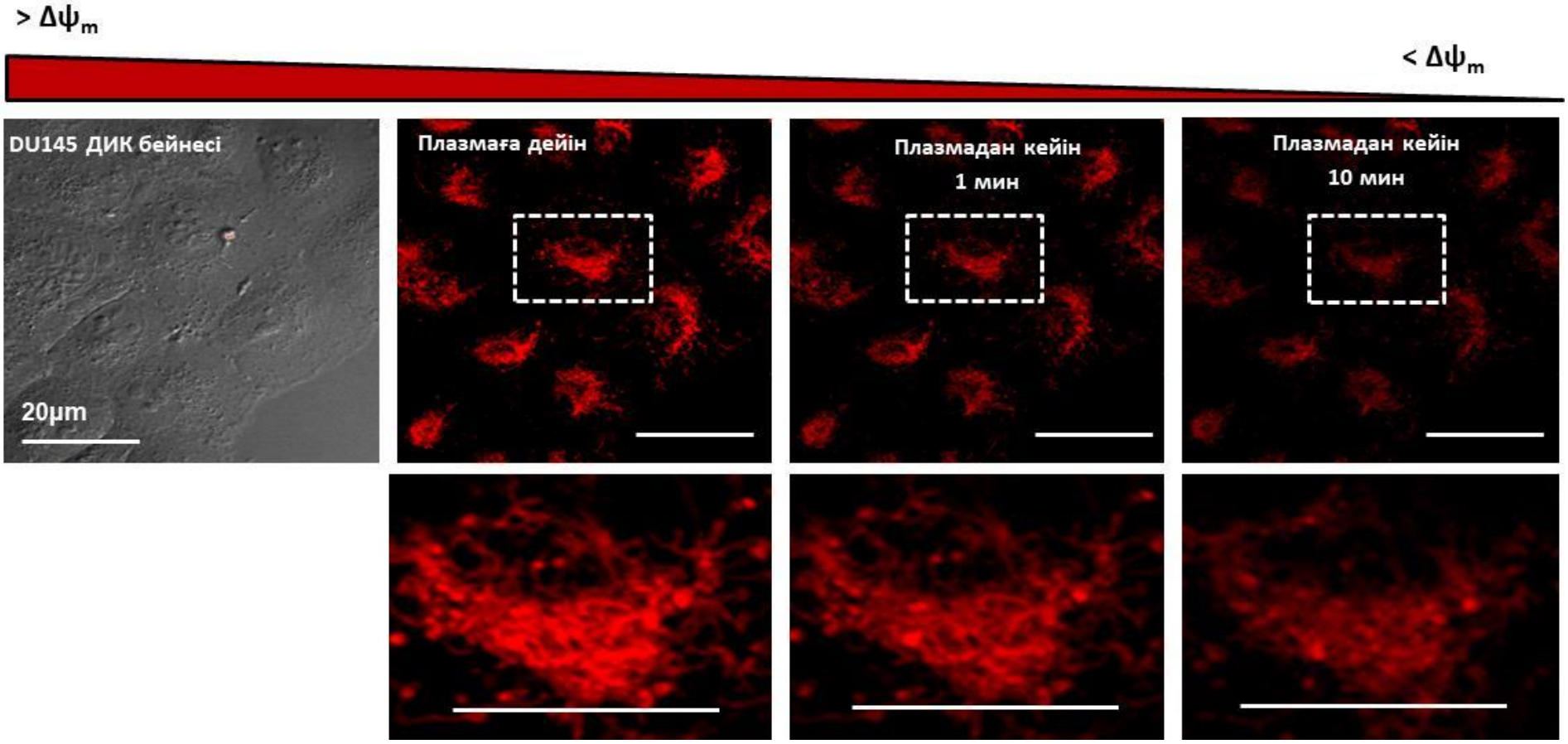
Клеткаларды плазмамен өңделген PBS ерітіндісімен ары қарай қоректік ортамен араластырмай жүргізу арқылы әсер еткенде, екі типті клеткаларда да (қалыпты PrEC және ісік DU145 клеткаларда) митохондриялардың мембраналық потенциалының 30%-ға (бақылаудан алынған пайыз бойынша) дейін төмендеуіне әкелді. Яғни 2 мкМ FCCP протонофорын клеткаларға қосқанда митохондриялардың мембраналық потенциалы коллапсына (жаппай күйреуіне) жақын нәтиже көрсетті. 20-суретте көрсетілгендей алғашқы екі минутта плазмамен өңделген PBS ерітіндісі қатерлі ісік клеткаларының мембраналық потенциалын төмендетпеді. Ал қалыпты клеткаларда мембраналық потенциал 80% дейін төмендеді (қара ромбиктер). Қалыпты клеткалардағы митохондриялардың мембраналық потенциал деңгейі төмендеуінің жалпы динамикасы қатерлі ісік клеткаларына қарағанда әлдеқайда күшті болды. Бұл қалыпты клеткаларға күштірек әсер ететінін көрсетеді [274-276].

Алайда, 1 және 10 минуттық плазмалық өңдеуден кейін қалыпты PrEC клеткалар 24 сағаттан соң 70%-ға дейін (бақылаудан алынған пайыз бойынша) өздерінің митохондрияларының мембраналық потенциалын қалпына келтіруге қабілетті болды. Метастатикалық DU145 клеткалары мембраналық потенциалын тек 40% деңгейінде ғана сақтады.




1 және 10 минут плазмамен өңделген клеткалар 24 сағаттан кейін өңдеуден кейін *Mito Red* бояуымен таңбаланған. Клеткалардың плазмамен индукцияланған PBS ерітіндісінде клеткалардың үздіксіз өңделуі, протонофордың қатысында митохондрияның мембраналық потенциалының төмендеуіне (бос шеңбер, FCCP) ұқсас, митохондриялық белсендірілу деңгейінің бұзылуына (қара ромб, Д7) әкелді. Нәтижелер орташа стандартты қатені есептеу (± SEM) негізінде алынды (n = 9). $^{**}P<0,01$.

Сурет 20 – Жанама төмен температуралық плазмалық өңдеудің DU145 (А) және PrEC (Ә) клетка митохондриясының мембраналық потенциалына әсері




Митохондриялар 25 нМ *Mito Tracker Orange* бояғышымен таңбаланды.

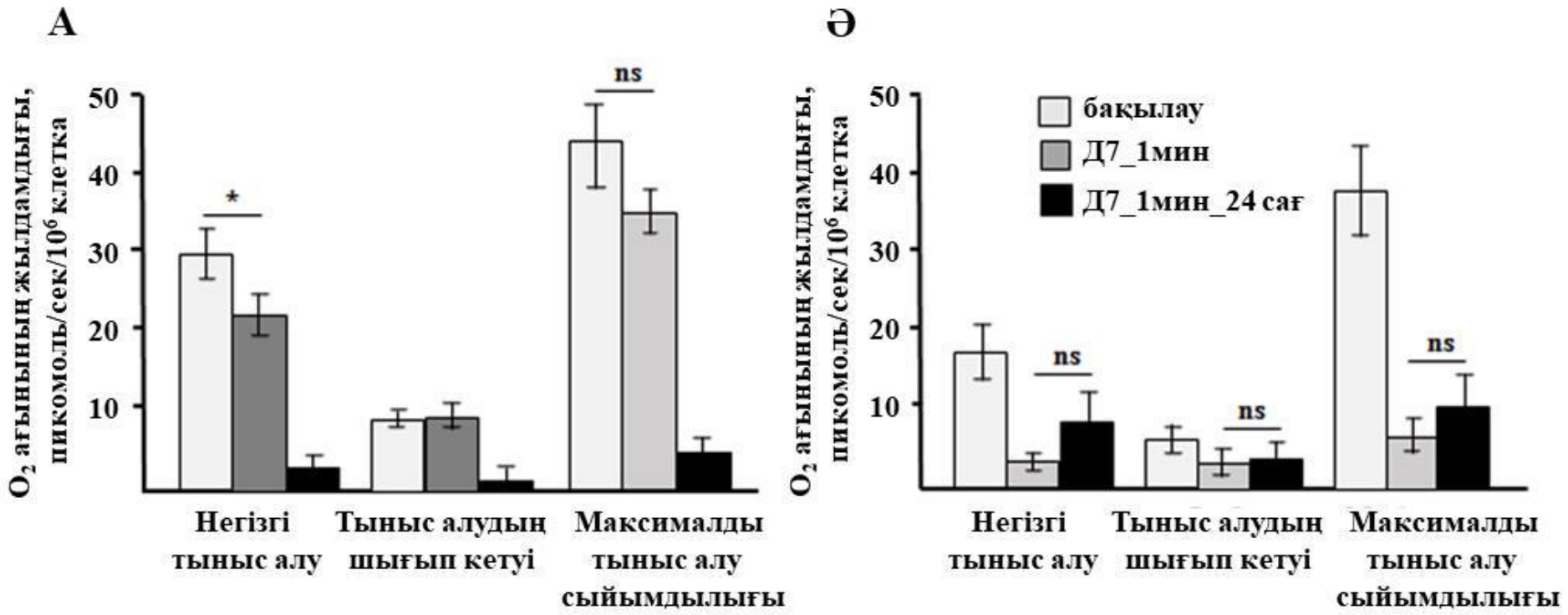
Сурет 21 – Төмен температуралық плазманың клеткалардағы митохондриясының мембаранылық потенциал (ΔΨm) жағдайына және морфологиялық құрылымына әсері

Сонымен қатар, плазмалық өңдеуден өткен клеткалар митохондрияларының морфологиялық құрылымында өзгерістері байқалды (21-сурет). Митохондриялардың морфологиялық құрылымы *Mito Tracker Orange* (25 нМ) бояғышы мен конфокалды лазерлі микроскоп көмегімен бағаланды. *Mito Tracker Orange* - митохондрияның мембраналық потенциалына сезімтал бояғыш болып табылады. Төмен температуралық плазмамен өңделмеген клеткалар митохондрияның құрылымы ұзынша жіпше тәрізді пішінде болатыны байқалды. Ал плазмамен 10 минут бойы өңделген клеткалар митохондрияларының керісінше ұзынша келген жіп пішінді құрылымының болмауын және олардың ісінген, дөңгелектенген күйін байқауға болады.

Митохондрияның мембраналық потенциалының осылайша төмендеуі, оның көптеген қызметіне, соның ішінде тотыға фосфорлануға да әсер еткендігінде болып табылады. Бұл процесс респирометрлік зерттеулерде дәлелденген (22-сурет). Д7 плазмасының 10 минуттан кейін әсер етуі және қоректік ортамен сұйылтуы 1 минуттан кейін әсер етуге қарағанда нашар болды. 1 минуттық өңдеу тәсілі клеткалық процестердегі модуляциялау механизмі мәліметтерін жан-жақты қарауға мүмкіндік берді. Сондықтан келесі мәліметтерде тек 1 минуттық плазма өңдеуінің әсерлері көрсетілген.

Бұл жұмыста негізгі міндеттердің бірі төмен температуралық плазмамен индукцияланған клеткалардың зақымдану механизмдерінде митохондрияның энергетикалық метаболизмі мен митохондриялық ОБТ түзілу процесіне мән бере отырып, қуық асты безі ісігі клеткаларына арнайы тағайындалған плазма әсерлерін зерттеу болды. Көптеген басқа ісік клеткаларынан қуық асты безі ісік клеткаларының ерекшелігі, гликолиз бен глюкозаны сіңіру жылдамдығының төмендігі [277] мен тотыға фосфорлануында. Панов (*Panov*) пен Орынбаеваның (*Orynbayeva*) жұмысында [9] DU145 ісік клеткаларының қалыпты клеткаларға қарағанда митохондриялар санының артуына байланысты жоғары тыныс алу белсенділігіне ие болатыны көрсетілген. Соған қарамастан, ісік клеткаларының митохондриялық мембранасының жоғары потенциалы (-20-30 мВ) мен үлкен мөлшерлі кальций сақтау қабілетіне байланысты олар апоптозға төзімді болып табылады [9, p. 3; 278]. Бұл метаболикалық айырмашылық ісік және қалыпты қуық асты безі клеткаларының плазма әсерінен туындаған стреске белгілі бір жауаптарына негізделген.

Жоғары (DU145) және төмен (PrEC) тыныс алу қабілетімен ерекшеленетін метаболиттік белсенділігі бар екі типті клеткаларда плазма әсерлері қандай дәрежеде өзгеретінін анықтау қызықты болды. Д7 үлгісінің төмен температуралық плазма ерітіндісінде 1 минут ішінде ұсталған қатерлі ісік клеткаларының негізгі тыныс алуы 29,8±2,7-ден 22,3±1,9 пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клеткалар деңгейіне дейін азайғанымен, протонның ағып кетуі және максималды электрон тасымалдау сыйымдылығының тыныс алуға әсері болмады (22А-сурет). PrEC клеткалары биоэнергетикалық параметрлерді төмендету арқылы төмен температуралық плазма қосуына бірден жауап берді (22Ә-сурет).




Клеткалардың эндогенді тыныс алу белсенділігін бағалау үшін клеткалар қосымша тыныс алу субстраттары қосылмаған клетка сыртындағы ортаға ұқсайтын тыныс алу буферінде өлшенді. Максималды тыныс алу қабілетін бағалау үшін, біріншіден клеткалар электрондардың тасымалдауын болдырмау үшін олигомицинмен тежелді, ал екіншіден клеткалар ең жоғары оттегі тұтыну қарқынына жету үшін FCCP протонофор мөлшерін ұлғайту арқылы тыныс алу тежелгенге дейін титрленді. Қуық асты безінің ісік (А) және қалыпты (Ә) клеткаларында дереу және 24 сағат инкубациядан кейін оттегіні тұтыну қарқыны. Мәндер 6 тәуелсіз тәжірибелері негізінде ұсынылды (± SEM). $^*P<0,05$, ns – айтарлықтай емес.

Сурет 22– Қуық асты безінің DU145 және PrEC клеткаларының тотыға фосфорлануына төмен температуралық плазма әсерінің респирометрлік талдауы

Плазмамен өңделген PBS ертіндісімен 1 минут бойы өңделген қалыпты (PrEC) клеткаларының негізгі тыныс алуы 18,7±3,6-дан 3,0±0,8 пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клеткалар деңгейіне дейін төмендеді. Сондай-ақ, максималды тыныс алу жылдамдығы да 40,9±7,2-ден 6,7±1,8 пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клеткаларға дейін кеміді. Бірақ протондардың электрон тасымалдау тізбегінен шығып кетуі өзгермеді.

Алайда, 24 сағат ішінде биоэнергетикалық белсенділігі азайған ісік клеткаларына қарағанда қалыпты клеткалар тотыға фосфорлану активтілігін қалпына келтіру процесін көрсетті (16Ә-, 19- және 22-суреттер) [270, б. 15-16; 279].

Келесі ретте, қатерлі ісік және қалыпты клеткаларға төмен температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісімен әсер етуі митохондрияның мембраналық потенциалының ($\Delta\psi m$) төмендеуін көрсетті. Дегенмен, өңдеуден кейін 24 сағаттан соң қалыпты клеткалар ісік клеткаларына қарағанда әлдеқайда жоғары деңгейде $\Delta\psi m$ сақтады. Яғни қалыпты клеткаларда $\Delta\psi m$ деңгейі 70% болса, ісік клеткаларында 40% болды (20-сурет). Мембраналық потенциалдың осындай деңгейге көтерілуі тірі қалған PrEC клеткаларының 24 сағат бойы қалпына келуіне мүмкіндік берді. Бірақ бұл мәндер статистикалық түрде айтарлықтай маңызды болмады.

Қуық асты безінің ісік және қалыпты клеткаларының ерекше метаболизміне байланысты төмен температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісі олардың тыныс алу қызметтеріне теріс әсер етуі байқалды. Алдын ала плазма арқылы өңделген PBS ерітіндісін қосқан кезде ісік клеткаларының тыныс алуы бірден төмендей қоймады. Керісінше, 24 сағат өткеннен кейін DU145 клетка линияларындағы тотыға фосфорлану митохондрияның мембраналық потенциалы деңгейіне дейін тиісінше күрт төмендеді (20А- және 22А-суреттер). Алайда, қалыпты клеткаларда плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің әсерінен төмендеген негізгі тыныс алу процесі байқалды (22Ә-сурет). Бұл плазмамен тікелей емес, яғни жанама түрде мембраналық зақымдаулардың себебінен митохондриялардың мембраналық потенциалының бәсеңдеуі (20Ә-сурет) сонымен қатар, митохондрияның кальций-секрециялық белсенділігін мембраналық потенциал арқылы белсендіретін цитозолдық кальций мөлшерінің жаппай өсуі сияқты бірнеше процестердің нәтижесі болуы ықтимал. Дегенмен, 24 сағат өткен соң қалыпты клеткаларында тыныс алу процесінің қайта қалпына келу белгілері байқалды [270, p. 11].

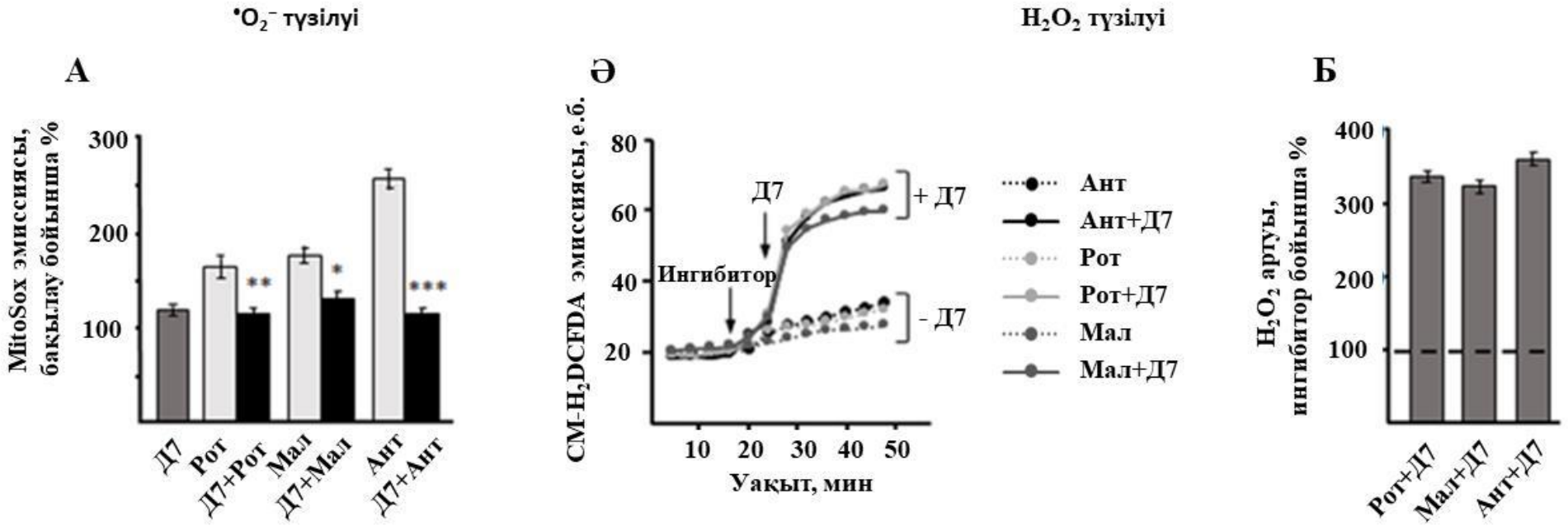
### 3.1.6 Төмен температуралық плазма әсерінен қуық асты безі ісік клеткаларында туындаған тотығу стресін талдау

Зерттеу жұмыстарында төмен температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің белсенді компоненттері өте зиянды оттегінің және азоттың белсенді түрлері екені көрсетілгендіктен [11, p. 6; 29, p. 80], төмен температуралық плазмамен туындаған тотығу стресінің дамуында ОБТ негізгі клеткалық метаболикалық реттеуші орталықтарының және ОБТ физиологиялық көздерінің бірі болып табылатын митохондрияның үлесі зерттелді.

Митохондрияның метаболикалық жағдайы осы органеллалар арқылы ОБТ генерациясының жылдамдығын анықтайды. Митохондриядан туындаған ОБТ-ның төмен температуралық плазмамен туындаған ОБТ-гі үлесі осы жұмыста қарастырылған мәселелердің бірі болып табылады. Осы жұмыста жанама плазмалық өңдеу жағдайында клеткалардағы негізгі плазма эффекторы оттегі және азоттың белсенді түрлері болып табылады, олар клеткаларды әсер ету кезінде осы түрлердің цитозолдық қорын байытады. Сонымен қатар, митохондрия компоненттеріне плазманың тікелей бағытталуы, сондай-ақ цитозолдық ОБТ-нің зиянды деңгейінің артуына әкелуі мүмкін. Электрондар ағынының баяулауы мембраналық потенциалдың төмендеуі, басқа мембраналық кедергілер мен митохондриялық матрицаның әртүрлі дегидрогеназаларының өзгеруіне байланысты электрондардың ағып кетуіне және супероксид түзілуін арттыруға ықпал етуі мүмкін [285, 286]. Қуық асты без ісігі клеткалары, табиғи түрде, митохондриялық емес көздерден туындаған ОБТ-нің жоғары ортасына ие екендігін атап өту керек [287], сондықтан плазмалық өңдеуден кейінгі ісік клеткаларында ОБТ шегі төмен болады деп күтілуде.

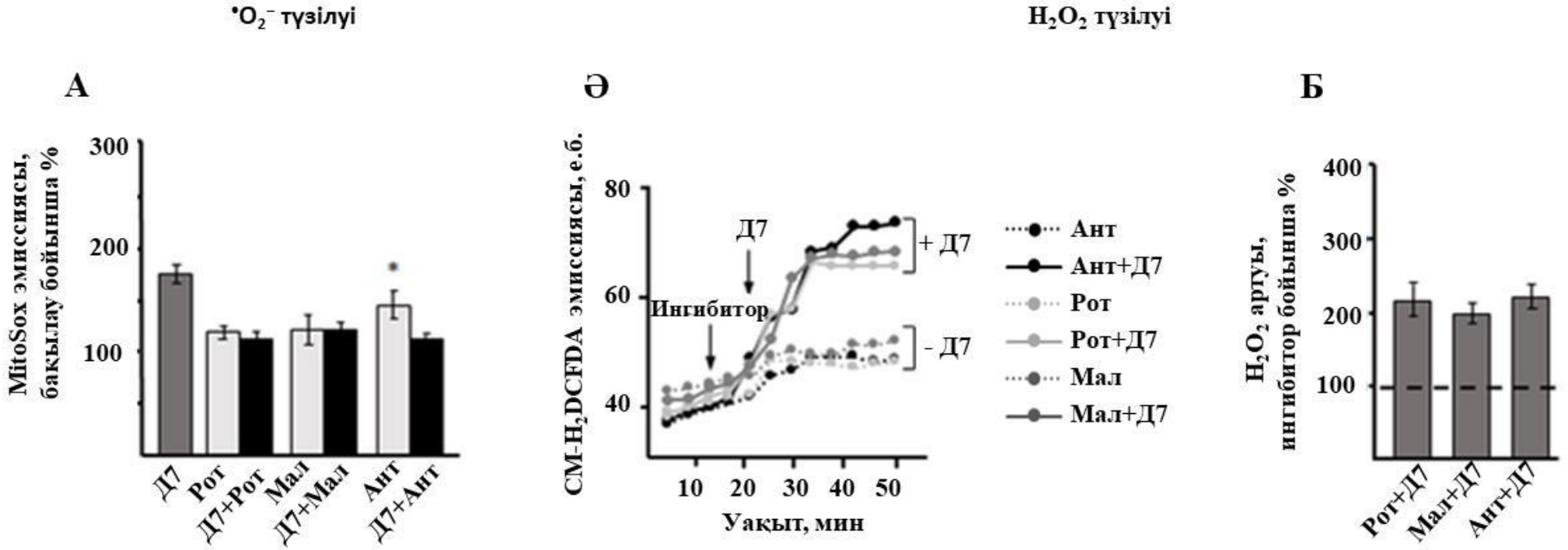
Бұдан бұрынғы зерттеулер, төмен температуралық плазманың тиімді компоненттері диэлектрлік тосқауыл разрядын қолдану кезінде түзілген түрлі оттегінің белсенді түрлері (ОБТ) екенін көрсетті [26, p. 12; 280]. Митохондриялық респираторлық ферментативті кешендер электрондардың ағып кету ықтималдығына байланысты ОБТ клеткаішілік көздерінің бірі болып табылады. Сондықтан, жоғарыдағы тәжірибелерде көрсетілгендей, плазма әсерінен метаболизмі теңгерімсіз болып табылатын митохондриялардың қаншалықты плазмамен индукцияланған тотығу стресіне ықпал ететінін бағалау қажет болды. Бұл тәжірибеде плазмалық-жанама ОБТ түзілуінде митохондриялық кешендердің қатысуы жайлы жұмыстар жасалды. Ол үшін митохондриялық арнайы супероксидіне сезімтал болып табылатын *MitoSox* және цитозолды $H_2O_2$ сезімтал *CM-$H_2$DCFDA* екі флуоресцентті зондтар пайдаланылды. Екі зондты пайдалану митохондрияларға тән плазмалық әсерлерді бөлуге мүмкіндік берді. Екі зондтың сигналдары ОБТ түзілуінің механизмдерін зерттеу үшін пайдалы құрал болып табылатын митохондриялық тыныс алу ингибиторларының қатысуымен бағаланды [281, 282].

Ағынды цитометрия өлшемдері митохондрияның тыныс алу кешендерінің I (1 мкг/мл ротенон, Рот), II (500 мкМ малонат, Мал) және III/IV (2,5 мкМ антимицин, Ант) ингибиторларнының қатысуымен жүргізілді (23 және 24 суреттер). Ингибиторлар плазмамен өңделген PBS ерітіндісі комбинациясында қолданылды және флуоресцентті зондтардың эмиссиясының динамикалық өзгерістері 50 минут бойы өлшенді. 23А суретте көрініп тұрғандай, плазмамен өңделген PBS ерітіндісін DU145 ісік клеткаларына қосуы 117%-ға (фонға қатысты алынған) супероксид босатылуының ұлғаюын индукциялаған.




Ағынды цитометрия өлшемдері митохондрияның тыныс алу кешендерінде I (1 мкг/мл ротенон, Рот), II (500 мкМ малонат, Мал) және III/IV (2,5 мкМ антимицин, Ант) ингибиторлары қатысуымен жүргізілді. А. Ингибиторлармен және плазмамен өңделген PBS арқылы клетка модуляциясы кезіндегі MitoSox сигналы өзгерістерінің сандық мәліметтері. Статистикалық маңыздылық плазма (Д7) индукцияланған сигналға қатысты колоннаның жоғарғы жағында көрсетілген. Ә. Ингибиторлармен және плазмамен өңделген клеткалардың CM-H2DCFDA эмиссиясының динамикалық өзгерістері. Б. CM-H2DCFDA сигналының өзгеруінің сандық мәліметтері. Нәтижелер орташа мәнде ± SEM ретінде ұсынылды (n = 9). $^{*}P<0,05$, $^{**}P<0,01$, $^{***}P<0,001$.

Сурет 23 – Қуық асты безінің қатерлі ісік клеткаларында (DU145) төмен температуралық плазмамен индукцияланған тотығу стресі




Ағынды цитометрия өлшемдері митохондрияның тыныс алу кешендерінің I (1 мкг/мл ротенон, Рот), II (500 мкМ малонат, Мал) және III/IV (2,5 мкМ антимицин, Ант) ингибиторларының қатысуымен жүргізілді. А. Ингибиторлармен және плазмамен өңделген PBS арқылы клетка модуляциясы кезіндегі MitoSox сигналы өзгерістерінің сандық мәліметтері. Статистикалық маңыздылық плазма (Д7) индукцияланған сигналға қатысты колоннаның жоғарғы жағында көрсетілген. Ә. Ингибиторлармен және плазмамен өңделген клеткалардың CM-H2DCFDA эмиссиясының динамикалық өзгерістері. Б. CM-H2DCFDA сигналының өзгеруінің сандық мәліметтері. Нәтижелер орташа мәнде ± SEM ретінде ұсынылды (n = 9). $^{*}P<0,05$.

Сурет 24 – Қуық асты безінің қалыпты клеткаларында (PrEC) төмен температуралық плазмамен индукцияланған тотығу стресі

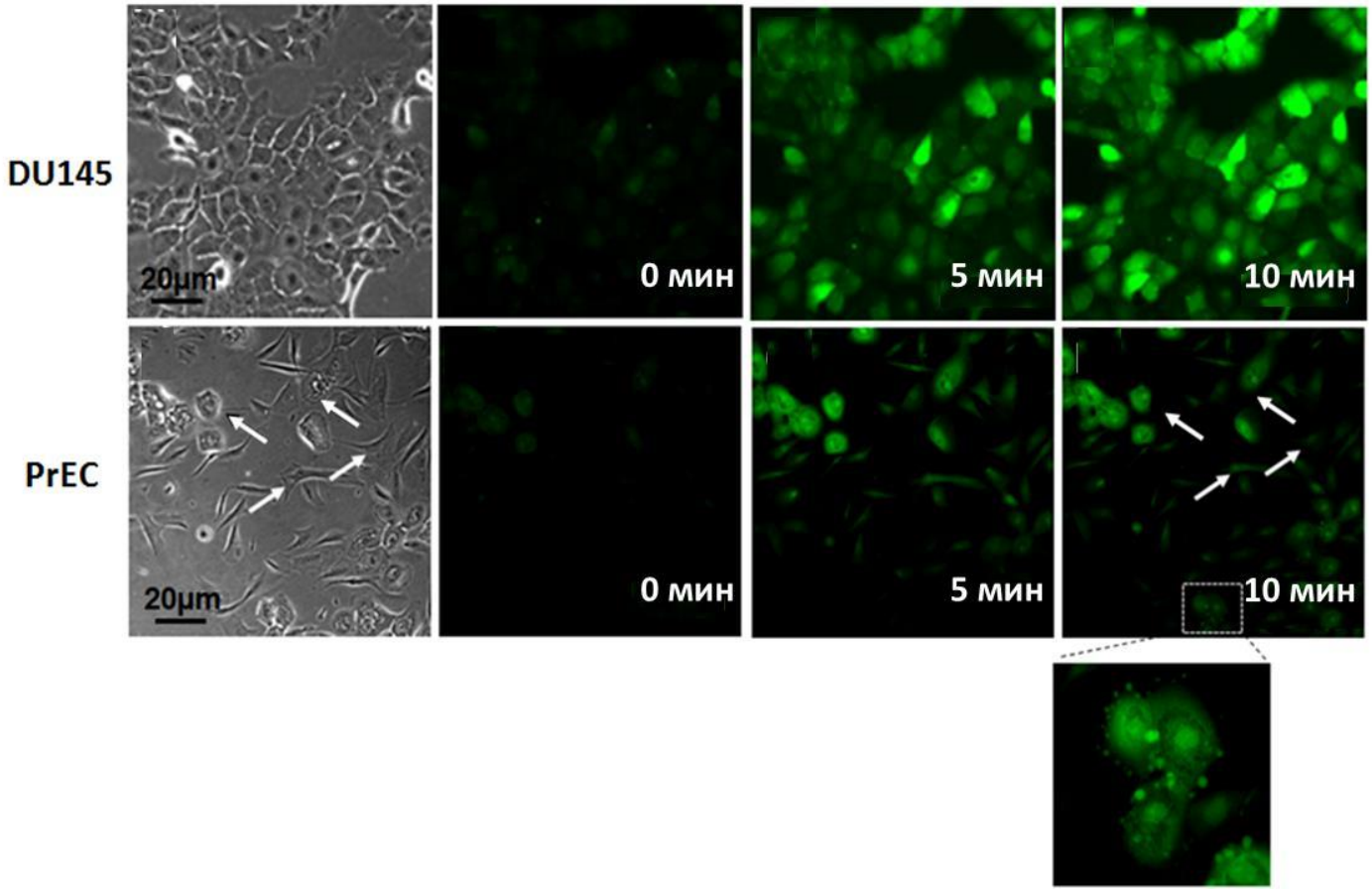
Плазмамен өңделген PBS ерітіндісінен кейін тыныс алу кешендерінің ингибиторларын қосу, кешен I (ротенон), кешен II (малонат) және кешен III/IV (антимицин), тиісінше тек 114%, 128% және 116% ғана супероксид шығаруды арттырды. Плазмамен өңделген PBS ерітіндісімен біріктірілген комбинациясында ингибиторлар жеке қолданылған кездегідей массивті ОБТ босатпады. Сонымен, жеке-жеке қолданылған ингибиторлар кезінде (ротенон, малонат және антимицин) супероксидті босату сигналы, сәйкесінше, бақылау сигналынан 166% (кешен I), 175% (кешен II) және 262%-ды (кешен III/IV) құрады (23А-сурет). Бақыланатын сигналды, сондай-ақ митохондриялардың плазма индукцияланған деэнергизациясына байланысты әсерлерді көрсете алатын басқа оттегінің белсенді түрлеріне MitoSox-тың мүмкін болатын жалған сезімталдығын тексеру үшін 2 мкМ FCCP ажыратқышына және 100 мкМ $H_2O_2$ жауабына MitoSox эмиссиясының өзгерістері өлшенді [270, p. 8-9].

Осы екі агенттердің зонд сигналын өзгертпейтіні және фон эмиссиясында ешқандай да бір өзгерістер түзбейтіні анықталды.

Құық асты безінің қалыпты клеткаларының ісік клеткаларынан айырмашылығы және төмен температуралық плазманың әсеріне сезімтал екені көрсетілді. Өйткені митохондрия арқылы тасымалданатын супероксид деңгейі бақылаумен салыстырғанда 176%-ға артты (24А-сурет). Бұл көрсеткіш жеке-жеке ротенон, малонат және антимицин ингибиторлары арқылы туындаған жағдайға қарағанда біршама жоғары (бақылаумен салыстырғанда сәйкесінше117%, 119% және 146%) болды [270, p. 9; 283, p. 26; 284].

Содан кейін, цитозолдің $H_2O_2$-ге сезімтал CM-$H_2$DCFDA сигналдық мөлшерін өлшеу негізінде барлық клеткалардың тотығу стресі дәрежесіне митохондриялардың әсері анықталды. Жоғарыда көрсетілген 23Ә-суретте, жоғары супероксидтің босап шығуына мүмкіндік туғызатын концентрацияларда көрсетілген митохондриялардың ингибиторлары, DU145 клеткаларында CM-H2DCFDA сигналының аздап өсуіне себеп болды. Плазмамен өңделген PBS ерітіндісін қосу, барлық пайдаланылған митохондриялық ингибиторларымен, яғни ротенонмен, малонатпен және антимицинмен түзілген сигналдарды тиісінше, 333%, 317% және 350%-ға дейін күрт ұлғайтты (23Ә- және 23Б-суреттер), ал бұл плазмамен жанама ОБТ-нің шығу тегі митохондриялық емес екендігін көрсетеді.

Қалыпты PrEC клеткаларына тыныс алу ингибиторларының қатысында PBS ерітіндісімен өңделген плазманы қосу $H_2O_2$ жеке-жеке ингибиторлардан туындаған $H_2O_2$ сигналдарымен салыстырғанда 216%, 194% және 222%-ға жоғары қалыптастыруға себеп болды (24Ә- және 24Б-сурет). Осылайша, қалыпты PrEC клеткаларында да плазмамен индукцияланған ОБТ негізгі көзі митохондриялар емес болып табылды [270, p. 9-10].




Флуоресцентті бейнелер *Zeiss Axiovert 40 CFL* инверторлық микроскобы арқылы алынды. Көрсеткіш арқылы сезімтал PrEC клеткалары көрсетілген. Төмен температуралық плазма әсерінің нәтижесінде қалыпты клеткалардың кейбір топтарында өзгеріс пайда болды. Бұл құбылыс қатерлі ісік клеткаларында байқалмады.

Сурет 25 – Қуық асты безінің қатерлі ісік (DU145) және қалыпты (PrEC) клеткаларында төмен температуралық плазмамен индукцияланған цитозолдық $H_2O_2$ түзілуі

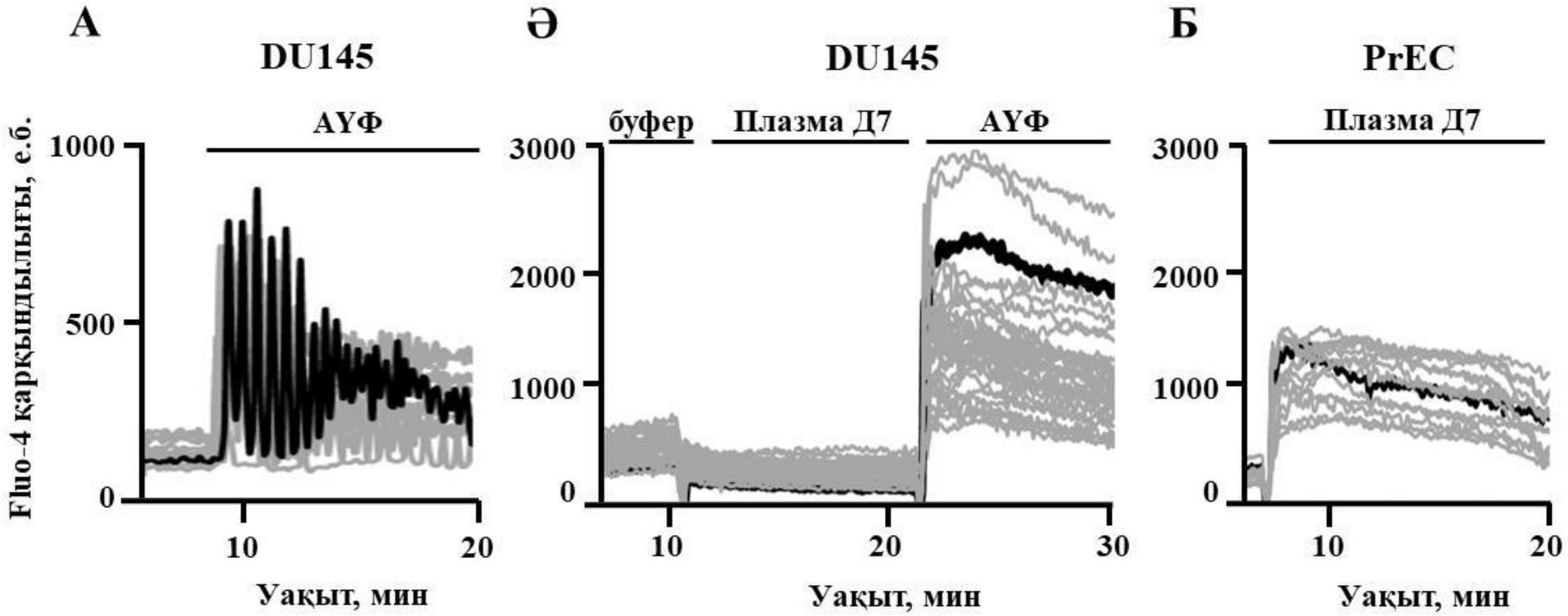
Сонымен қатар, плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің әсерінен туындаған тотығу стресі, ағынды цитометрия өлшеулерімен қатар, микроскопиялық талдау әдісі арқылы да цитозолдық сутегінің асқын тотығының жарқырау қарқындылығына байланысты бағаланды (25-сурет). Мәліметтерді сандық бағалаудан бөлек, қосымша бейнелеу тәсілі тотығу стресі нәтижесінде клеткалардың морфологиялық өзгерістерін бақылауға мүмкіндік берді. Қуық асты безінің DU145 қатерлі ісік және PrEC қалыпты клеткалары 2 μM CM-H2DCFDA (Ex/Em толқын ұзындығы 495/527 нм) қараңғы жерде 15 минут инкубацияланды және Zeiss Axiovert 40 CFL инверторлық микроскоп көмегімен бақыланды. Төмен температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісін қосу кезінде екі клетка типтері де цитозолда сутегі асқын тотығының артуы негізінде жауап қайтарды. Ал қалыпты клеткалардың кейбір түрлері бірнеше шағын мембраналық өзгерістердің түзілуімен сипатталды. Мұнда төмен температуралық плазмамен индукцияланған химиялық заттардың цитоқаңқаның қалыпты клеткалардағы кальций-жанама модуляциясында күшті әсерін көрсетеді. Бұл құбылыс қуық асты безінің қалыпты клеткаларында ғана байқалды, ал ісік клеткаларының морфологиясында мұндай өзгерістер блдмады [270, p. 8; 283, p. 26; 284 p. 61-62].

Сонымен, ОБТ генерациясының тыныс алу тізбегінің арнайы сайттарының рөлі, яғни I, II және III кешендердің төмен температуралық плазмамен индукцияланған әсерлері бағаланды. I және III кешендер электрондардың ағып кетуінің классикалық сайттары болып табылады [282, p. 6]. Дегенмен, II кешеннің ОБТ түзілуіне әсері, басқа да кешендердің әсерлеріне де назар аударылды [281, p. 216; 288-290]. ОБТ қалыптастыру механизмдерін зерттеуде ферменттік кешендердің ингибиторлары пайдалы құрал болып табылады. Ротенон электронының тікелей ағыны, I кешеннің Q коферменті сайтын қалпына келтіруіне алып келеді [291]. Бұл жағдайларда I кешендегі ОБТ түзілуі, сондай-ақ II кешеннен кері артқан электрондар ағынына байланысты туындайды. Малонат II кешеннің сукцинат байланыстыратын сайтын тежейді [290, p. 27262]. Малонатты тексерудің негіздемесі төмен температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісі митохондриялардың мембраналық потенциалын төмендететін фактісі болды (20-сурет). Ал II кешен митохондрияның энергиясына тәуелді емес және төмен мембраналық потенциал жағдайында ОБТ түзе алады. Антимицин III кешеннің кофермент Q сайтын азайтады [292]. DU145 клеткаларда бұл ингибиторлар плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің қатысуымен салыстырғанда әлдеқайда жоғары супероксид түзілуін береді (23А-сурет) және плазмамен өңделген PBS ерітіндісінен кейін ингибиторларды қосу плазма әсерін тудырмады. Ісік клеткаларының плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің әсері супероксид фонын бақылаумен салыстырғанда 117% ғана арттырды. Плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің әсеріне ұшыраған қалыпты клеткаларда тек ингибиторлар әсеріне ұшыраған және плазмамен өңделген PBS ерітіндісімен бірге үйлесіне қарағанда жоғары супероксид түзілуі байқалды (24А-сурет). Бұл нәтижелер төмен температуралық плазмамен өндірілген ОБТ митохондрияларда шығу тегі бір ме

деген сұрақты тудырады. Сондай-ақ, цитозолдық $H_2O_2$-сезімтал зондын пайдалана отырып, плазмалық әсерлері дәлелденді. Төмен температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісі әртүрлі белсенді түрлерді, соның ішінде сутегінің асқын тотығын түзеді. $H_2O_2$-нің зарядталмаған молекулалары клеткалық мембранаға оңай енеді де, сутегінің асқын тотығының эндогендік қорын байытады және плазмамен алынған басқа да түрлермен бірге, сутегінің асқын тотығын қоса, әртүрлі клеткаішілік ОБТ түзілуін тудырады. Бұрынғы жұмыстарда [11, p. 1-11; 29, p. 80; 104] көрсетілгендей, бұл жұмыста да, зерттелген клеткаларда плазмамен туындаған күшті тотығу стресі анықталды (23- және 24-суреттер). Бірақ тек ингибиторлары қосылған $H_2O_2$ деңгейі ингибиторларға дейінгі плазмамен өңделген PBS ерітіндісімен түзілгенмен салыстырғанда өте төмен болды. Клеткаларға төмен температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісін қосу клеткалардың екі типінде де цитозолдық $H_2O_2$ деңгейін бір шама жоғарылатты. Бұл ісік және қалыпты клеткалардың метаболиттік айырмашылықтарында ОБТ зиянды түрлерінің ұлғайғанын көрсетті. Нәтижесінде, плазма арқылы түзілген мембраналық потенциалдың өзгеріссіз түрде төмендеуі салдарынан митохондрияларда ОБТ туындауына әкелетіні байқалды. Бұл белгілі бір дәрежеде тотығу түрлерінің қорын байытады, бірақ жалпы бұл жағдайларда тотығу стресі митохондриялар арқылы болмайтынын көрсетеді. Митохондрияның төмен температуралық плазма арқылы түзілген ОБТ-не әлсіздігі [293], митохондрияның, әсіресе, жоғары жұмыс жүктемесіне ие қуық асты безінің қатерлі ісік клеткалары митохондрияларының зақымдануының соңғы механизмі болуы мүмкін.

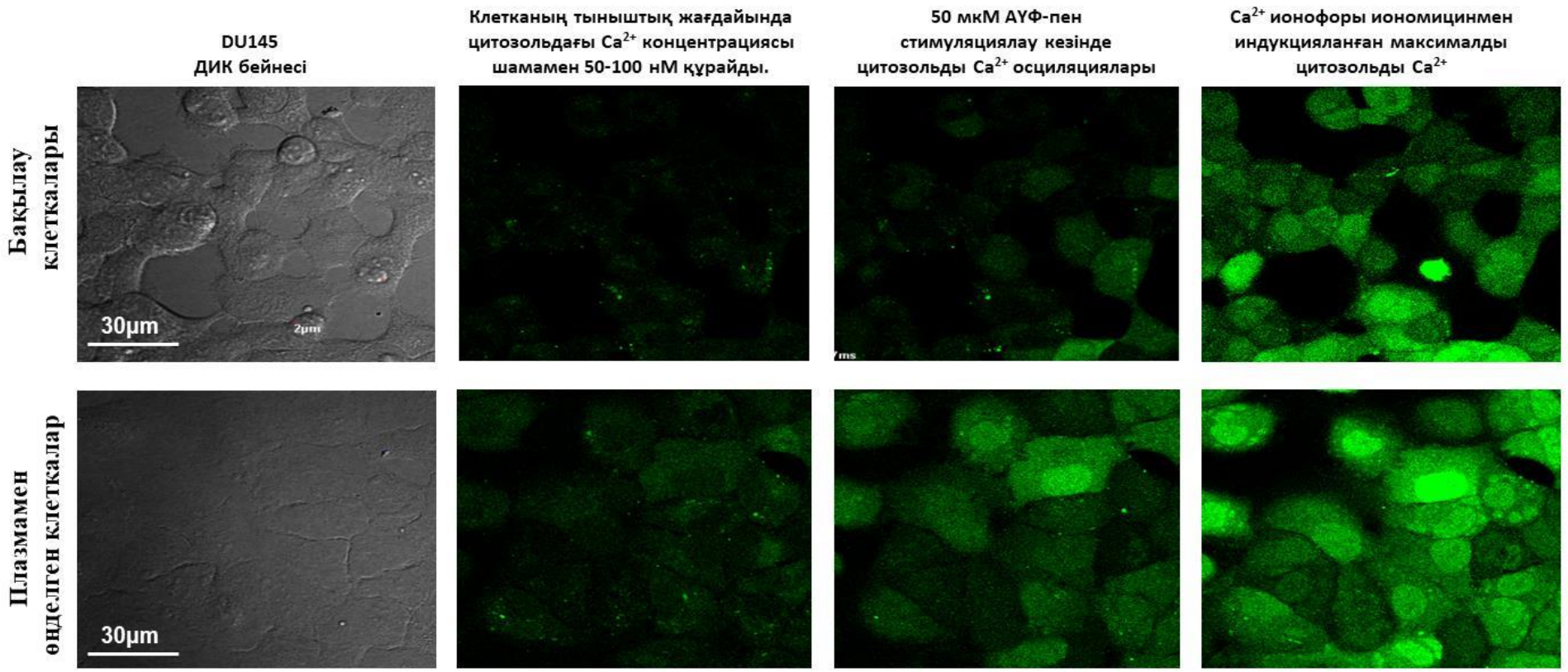
### 3.1.7 Цитозолдық кальций деңгейіне төмен температуралық плазманың әсері

Әртүрлі стресс факторлары үшін клетка жауабының бірі ретінде цитозолдық кальций ауытқуын келтіруге болады. Дегенмен, митохондриялар кальций гомеостазының негізгі реттегіштері ретінде белгілі. Яғни клеткаларды артық кальций мөлшерінен қорғау үшін осы ионының көп мөлшерін жұтып алуға қабілетті болып табылады. Бұл жұмыста қуық асты безі DU145 ісік және PrEC қалыпты клеткалары түбі жұқа шыныдан жасалған диаметрі 35 мм *MatTek* табақшаларына 200000 клетка тығыздығында отырғызылды. Клеткалар қоректік ортадан PBS ерітіндісімен (құрамында $Ca^{2+}$ және $Mg^{2+}$ жоқ) шайылды және қараңғы жерде бөлме температурасында 15 минут бойы концентрациясы 2 мкМ *Fluo-4 AM* флуоресцентті зондымен таңбаланды. Таңбалаудан кейін клеткалар екі рет PBS ерітіндісімен шайылды және тұрақтандыру үшін қосымша 15 минут буферде ұсталды. Клеткалар 0,5 мл PBS ерітіндісімен жабылды, ал содан кейін клеткаларға 1 мл таза PBS немесе плазмамен өңделген PBS қосылды. Содан соң, цитозолдық кальций тербелістері конфокалды лазерлік сканерлеуші микроскопы арқылы 570 нм жарық эмиссиясында анықталды. 26-суретте DU145 және PrEC клеткаларда плазмамен индукцияланған цитозолдық кальций модуляцияларының конфокалды микроскоп арқылы талданған спектрлік жазбалары көрсетілген.




Конфокалды микроскоп арқылы алынған спектрлік түпнұсқа жазбалары. 5 тәжірибенің әрқайсысында бағаланған шамамен 50 клеткалардан жиналған мәліметтерді көрсетеді.

Сурет 26 – DU145 (А, Ә) және PrEC (Б) клеткаларында плазмамен индукцияланған цитозолдық кальций модуляциялары




Түбі шыныдан жасалған табақшаларға егілген DU145 клеткаларының 570 нм жарық эмиссиясында анықталған және бақыланған флуориметриялық конфокалды микроскоп арқылы алынған бейнелері. Жай PBS-пен немесе плазмамен өңделген PBS-пен 10 минут инкубациядан кейін клеткалар 50 мкМ АҮФ қышқылымен және иономицинмен индукцияланды.

Сурет 27 – DU145 клеткаларында плазмамен индукцияланған цитозолдық кальций модуляциясы

Бұл тәжірибеде DU145 ісік клеткаларының жанама плазмалық өңдеуге $Ca^{2+}$ көтерілуі арқылы жауап бермейтіні анықталды. DU145 клеткаларды 10 минут бойы плазмамен өңделген PBS ерітіндісімен әсер ету кезінде цитозолдық кальций сигналының кез-келген өлшенетін әсерін тудырмады (26Ә-сурет). Ал PrEC клеткаларында цитозолды кальций сигналы плазмамен өңделген PBS ерітіндісін қосқаннан кейін бірден көтерілді (26Б-сурет). Төмен температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің құрамында $Ca^{2+}$ және $Mg^{2+}$ жоқ екендігін ескеру маңызды. Сондықтан клеткаларда байқалған кальций сигналы ішкі резервуардан пайда болғанын көрсетеді. DU145 клеткаларында кальций сигналдық жүйесінің тиімділігін тексеру үшін оларға 50 мкМ АҮФ қышқылы қосылды (26Ә-сурет). Бұл лиганда кальцийге тәуелді $IP_3$-сигналдық жолдарының белгілі стимуляторы болып табылады. Плазмамен өңделмеген клеткаларға АҮФ қышқылын қосу кезінде $Ca^{2+}$ жиі тербелістері туындады және ол уақыт өте келе басылды (26А-сурет). Плазмамен өңделген PBS ерітіндісімен инкубацияланған DU145 клеткаларға АҮФ қышқылын қосқанда цитозолдық кальцийдің тұрақты өсуі байқалды. Бұл метастатикалық клеткалардың кальций-сезімтал жүйелерінің өзгеруін дәлелдейді (26Ә-сурет) [270, p. 12].

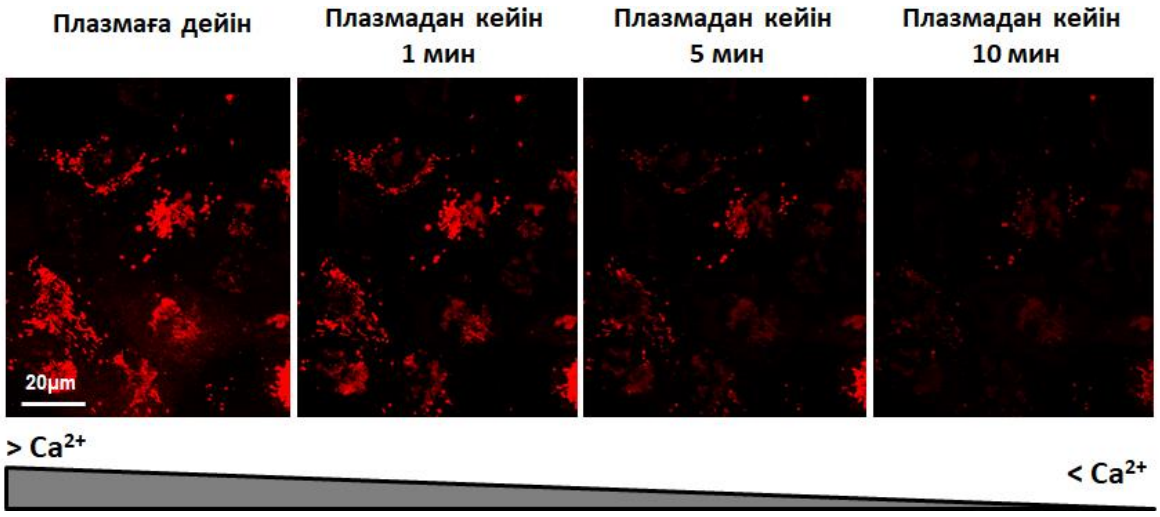
Сонымен қатар, бұл тәжірибелерді флуоресценттік суреттер негізінде де анықтауға болады (27-сурет). Мұнда максималды цитозольды $Ca^{2+}$ мөлшерін индукциялау үшін 2мМ $CaCl_2$-де дайындалған 2 мкМ иономицин ионофоры қосылды [270, p. ]. Төмен температуралық плазмасымен өңделген PBS қосындысы, яғни Д7 үлгісі әсерінен митохондриядағы кальций иондары байқалды. Кальций иондарының ($Ca^{2+}$) митохондриялық матрикске жұтылуы клеткалық қызметте өте маңызды болып табылады. Матрикстің $Ca^{2+}$ деңгейінің реттегіші ретіндегі бұл ағыны энергияның түзілуіне әсер етеді, сондай-ақ, клетка өлімін индукциялауы мүмкін [294].

Төмен температуралық плазмамен өңделген клетка митохондрияларында кальций мөлшерін анықтау үшін арнайы митохондриядағы кальцийге сезімтал *Rhod-2* флуросцентті бояғыш қолданылды. Бұл жүргізілген қысқа мерзімді сынақта төмен температуралық плазманың өңдеу мерзімін ұзартқан сайын, DU145 клеткаларындағы митохондрияларда кальций құрамының төмендеуі байқалды (28-сурет).

Энергетикалық және тағы басқа да көптеген клеткалық процестердің тиімділігі цитозолдық $Ca^{2+}$ арқылы реттелетіндіктен, митохондриялық тотыға фосфорланумен қатынаста болатын цитозолдық кальцийдің өзгеруіне плазмалық өңдеудің әсері тексерілді (26-сурет).

Сонымен қалыпты клеткалардағы тұрақты түрде цитозолдық кальций мөлшерінің артуы, митохондрияның қызметінің бұзылуына, сонымен қатар клеткаішілік процестердің өзгерістерге ұшырауына әкелді. Мұнда ерекше көңіл аударатын жағдай, ол қуық асты безі ісік клеткаларындағы цитозолдық кальцийдің деңгейі плазмамен өңделген PBS ерітіндісімен әсер еткенде ешқандай өзгерістің байқалмайтындығы. Алайда, кальций мен кернеуге сезімтал клеткалық белоктар мен мембраналық компоненттерді қамтитын

клеткалық кальций сигналдық жүйелері плазма әсері барысында клеткадан тыс әсерлерге сезімталдық танытты.



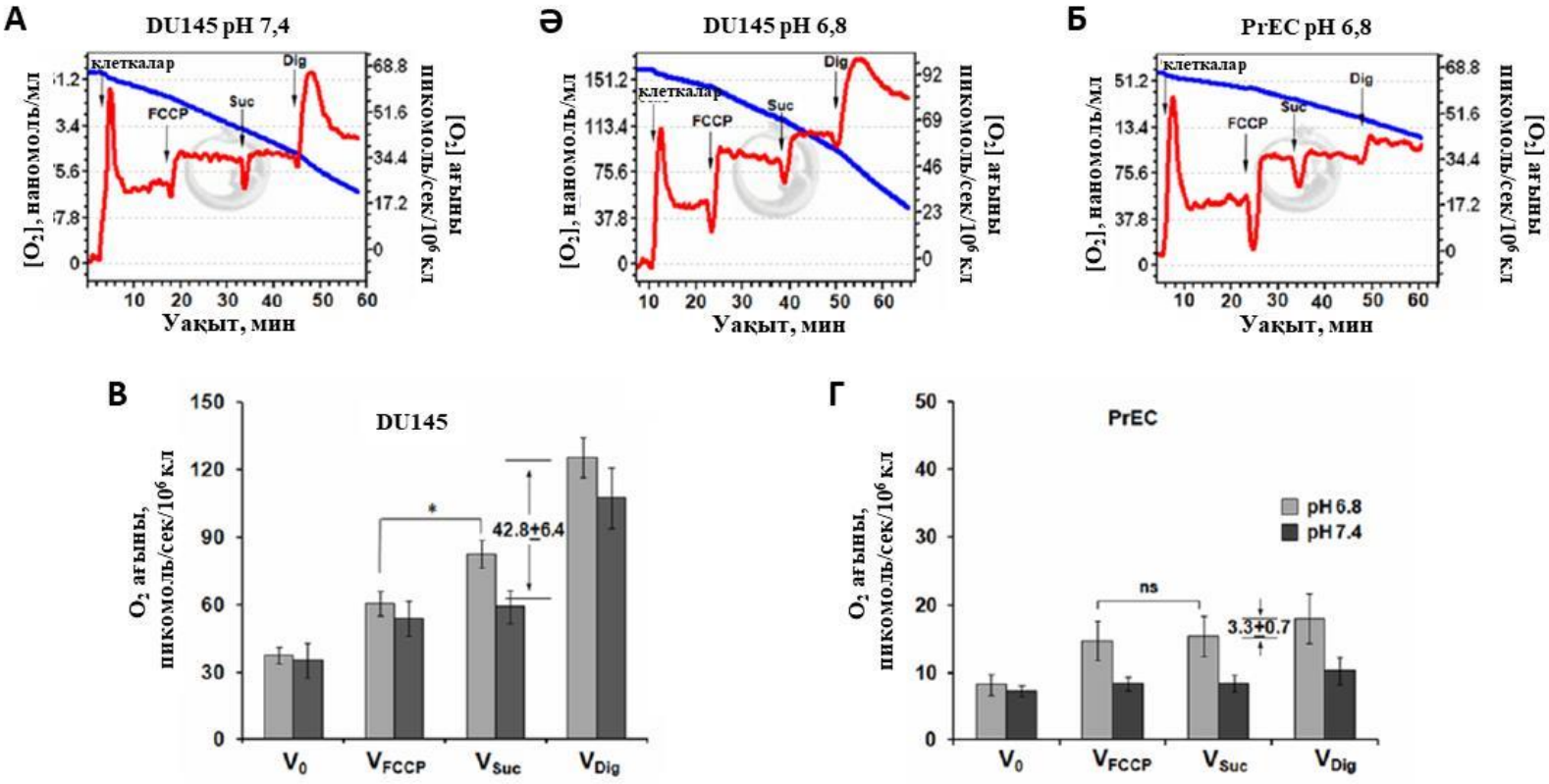

Сурет 28 – DU145 клетка линияларын плазмамен өңделген PBS ерітіндісі арқылы инкубациялауда митохондриялардағы кальций концентрациясының төмендеуі

Пуринергиялық рецепторлар арқылы байланысатын АҮФ қышқылы плазмасымен өңделген клеткалардың ынталандыру тұрақты цитозолдық кальций мөлшерінің артуына әкелді. Плазмалық өңдеуге ісік клеткаларының осындай жоғары тұрақтылық механизмдері ары қарай да зерттеуді қажет етеді [270, б. 12].

### 3.2 Қышқыл орта жағдайында қуық асты безі ісік клеткаларының энергетикалық метаболизмін зерттеу

3.2.1 Қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткаларындағы экзогендік сукцинаттың тотығуын pH ортасы қышқыл буферде талдау

Адамдарда кездесетін ісіктердің көпшілігінде, оның ішінде қуық асты безі ісігінде де, клеткадан тыс pH жүйелі түрде қышқыл болып келеді. Сондықтан, бұл зерттеуде ісіктердің энергетикалық метаболизмінің модуляциясына қышқылдық үлесін бағалау үшін респирометрлік өлшеулерде буферлердің pH физиологиялық pH 7,4-тен pH 6,8-ге дейін төмендету арқылы ісіктің микроортасы өзгертілді. Неғұрлым қышқыл pH 6,0-да алынған клеткалық жауап, pH 6,8 буферінде алынған клеткалық жауаппен ұқсас болды. Яғни кем дегенде оттегіні тұтынудың орташа жылдамдығы бойынша ұқсас болды (деректер көрсетілмеген). 29-суретте pH физиологиялық ортаға жақын және қышқыл буферлерде сукцинат арқылы ынталандыру қуық асты безінің DU145 ісік және PrEC қалыпты клеткаларының тыныс алуы көрсетілген.




А, Ә. pH 7,4 және 6,8 буферінде DU145 клеткаларының оттегін тұтыну талдауы. Қысқа тұрақтандыру кезеңінен кейін (негізгі тыныс алу, $V_0$), тыныс алу ферменттері 40 нм FCCP ($V_{FCCP}$) көмегімен белсендірілді, содан кейін клеткаларға 10 мМ сукцинат ($V_{Suc}$) қосылды. Тәжірибе соңында сукцинаттың тасымалдаушы емес жанама ағынын тудыру үшін 10 мкМ дигитонин ($V_{Dig}$) қосылды. Б. pH 6,8 буферінде PrEC клеткаларының оттегін тұтынуы. В, Г. DU145 және PrEC клеткаларының оттегін тұтыну қарқынының сандық мәліметтері ± S.E.M. орташа мәні ретінде ұсынылған. (n = 6), *p < 0,05, ns – айтарлықтай емес. DU145 клеткаларда дигитонинмен жеделдетілген сукцинат тотығуы PrEC клеткаларына қарағанда шамамен 12 есе жоғары (сандық кірістірмелер).

Сурет 29 – DU145 ісік және PrEC қалыпты клеткаларының әртүрлі pH жағдайында

DU145 клеткалардың ынталандырылмаған негізгі тыныс алуы екі жағдайда да айтарлықтай айырмашылық көрсетпеді. Яғни физиологиялық pH (7,4) жағдайында 35,3 ± 7,6 пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клетка және қышқыл pH кезінде 37,4 ± 3,7 пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клетка болып табылды. Алайда, pH 6,8 буферінде FCCP белсендіру кезінде клеткалық қышқылдану жауабы анағұрлым айқын болды (60,6 ± 5,5 пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клетка, pH 7,4 кезінде 53,9 ± 7,7 пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клетка салыстырғанда). FCCP алдын ала өңдеу нұсқаулығы тыныс алу ферменттерін белсендіру және "ашыққан клеткалар" метаболиттік жағдайын тудыру болды. pH 7,4 жағдайында сукцинаттың DU145 клеткаларда тыныс алуды арттырмағанын байқауға болады. Тек дигитонинді қосу сукцинаттың цитозольге зақымдалған мембрана арқылы жаппай ағуына ықпал етеді. Буферде кальций концентрациясын дигитонин өткізгіштігі кезінде митохондрияларды зақымдамайтындай клеткаішілікке (100 нМ) жақын концентрациясына дейін жеткізгенін атап өту маңызды. Керісінше, қышқыл pH жағдайында FCCP алдын ала өңделген 60,6 ± 5,5 пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клетка жылдамдықпен тыныс алатын DU145 клеткалары сукцинатты белсенді түрде пайдаланып, нәтижесінде оттегіні тұтыну қарқыны 82,4 ± 6,1 пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клеткаға дейін айтарлықтай жоғарылауына әкелді (29Ә-сурет, 4-кесте). DU145 клеткаларға дигитонинді қосу одан әрі қарай сукцинаттың тотығу жылдамдығын арттырады (29Ә-сурет). Бірнеше минуттан кейін тыныс алу жиілігі төмендеді. Бәлкім, эндогенді аденин нуклеотидтер қорын сұйылту мен мембраналық перфорациясынан болатын иондық үйлесімсіздігіне байланысты болуымен түсіндіріледі [278, p. 1669; 295].

Дегенмен, зақымдалмаған митохондриялық мембрана дигитонинмен тесілген клеткалар шегінде сақталады. Өйткені экзогенді сукцинат қатысында клеткалар ұзақ уақыт бойы жоғары жылдамдықпен тыныс алуын жалғастырды.

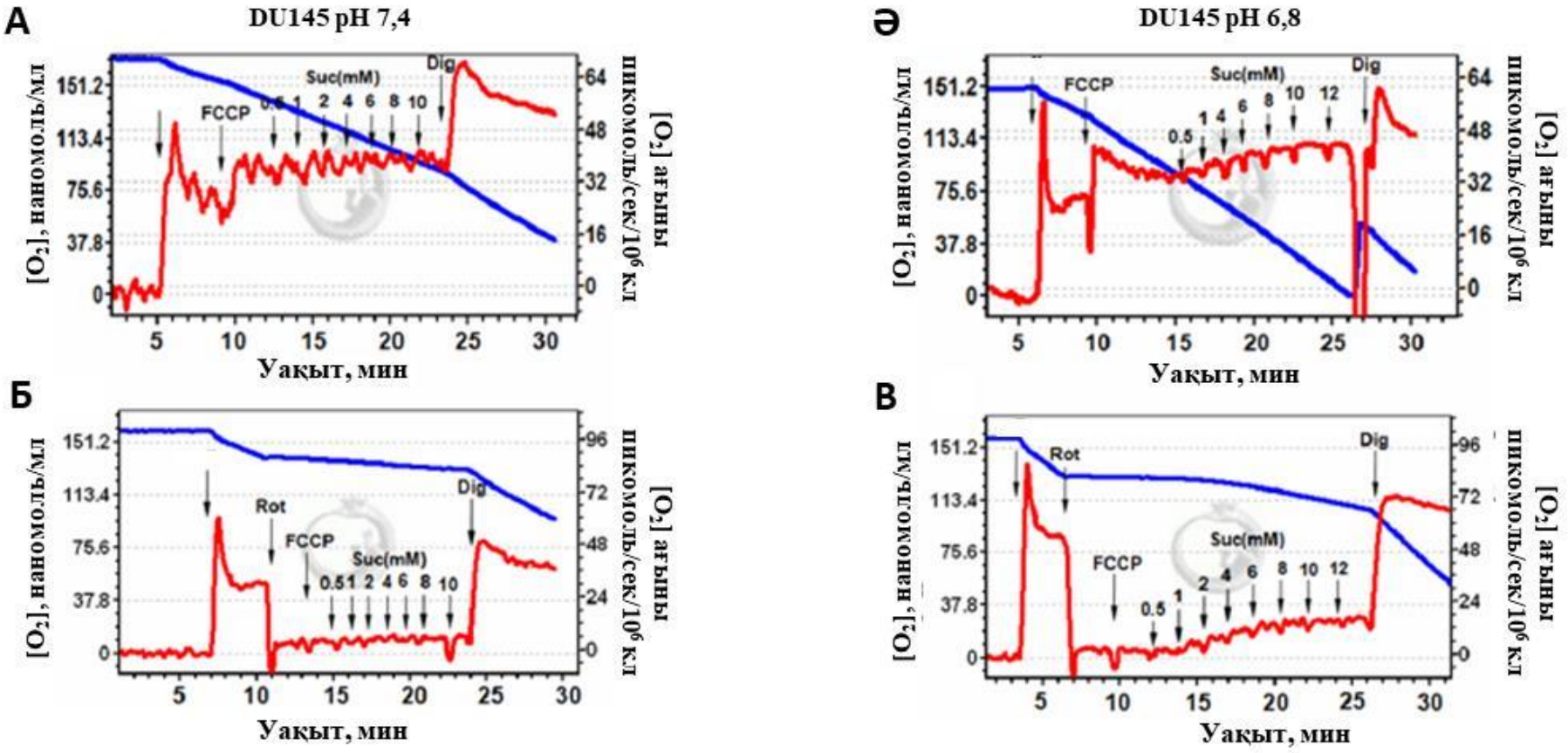
Кесте 4 – pH 6,8 тыныс алу буферінде әртүрлі клетка линияларынның оттегін тұтыну қарқыны

| Клетка түрі | Оттегі ағынының қарқыны, пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клетка | | |
|---|---|---|---|
| | $V_0$ | $V_{FCCP}$ | $V_{Suc}$ |
| DU145 | 37,4± 3,7 | 60,6±5,5 | 82,4±6,1 |
| PrEC | 8,3±1,6 | 14,7±2,9 | 15,4±3,0 |
| RAEC | 25,9±4,0 | 45,4±9,8 | 36,4±4,8 |
| SKOV-3 | 26,1±3,0 | 31,7±4,2 | 49,6±8,5 |
| *Ескертпе - Инкубация жағдайлары 29-суреттегі түсіндірмемен бірдей. $V_0$, тек эндогенді субстраттар негізіндегі тыныс алу қарқыны, $V_{FCCP}$, 40 нМ FCCP белсендірілген тыныс алу қарқыны, $V_{Suc}$, 10 мМ сукцинат қосылғаннан кейінгі тыныс алу қарқыны (n= 6). | | | |

PrEC қалыпты қуық асты безі клеткалары қышқыл буферде сукцинат қосуына жауап бермеді (29Б-сурет). Сондай-ақ дигитонин пермеабилизациясына да жауабы әлсіз болды.

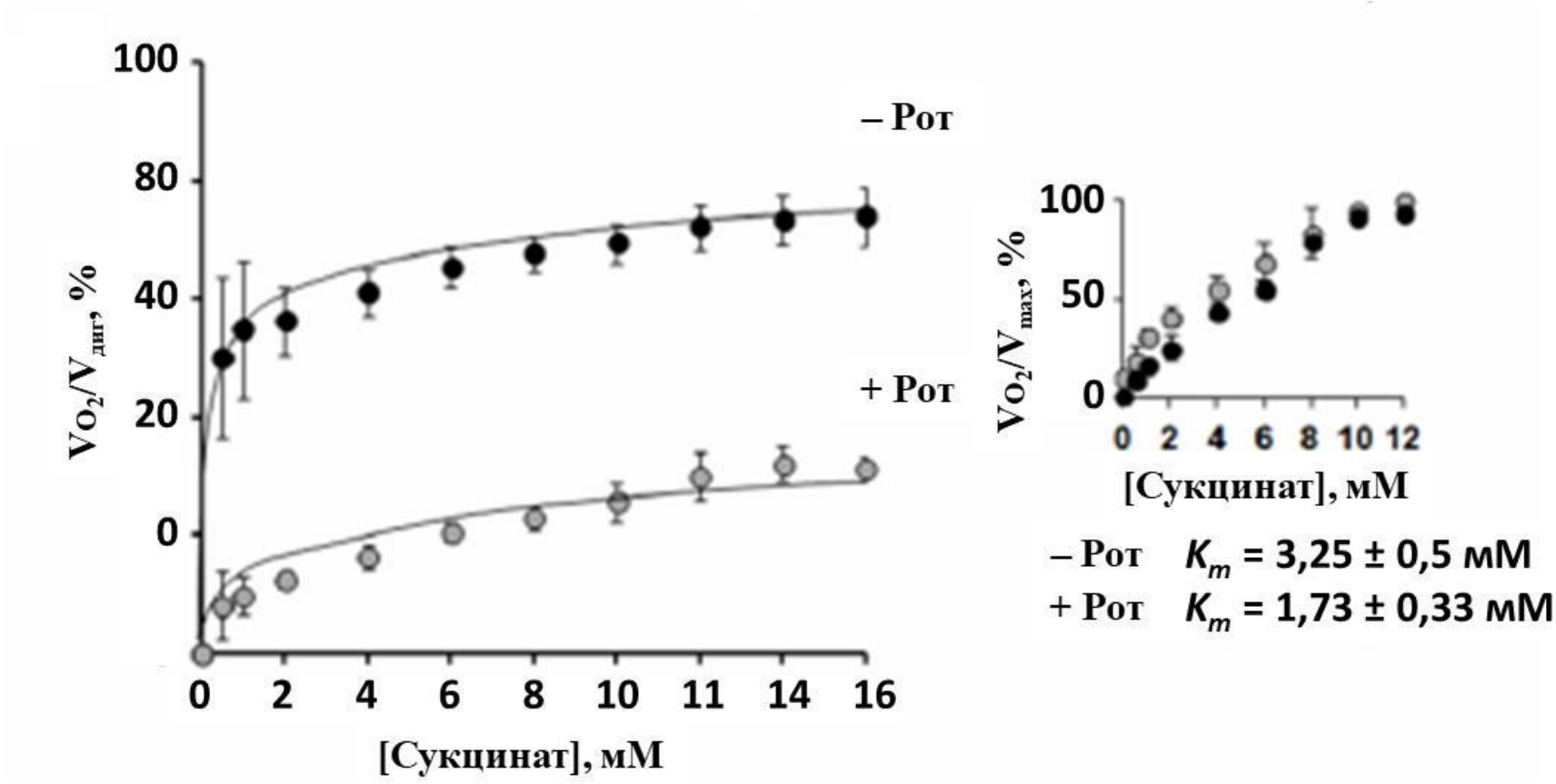
Сукцинат және дигитонин арқылы ынталандырылған тыныс алу арасындағы айырмашылық DU145 клеткаларда 42,8 ± 6,4 пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клетка және PrEC клеткаларда 3,3 ± 0,7 пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клетка құрады (29В- және 29Г-суреттер). Бұл PrEC қалыпты клеткаларға қарағанда DU145 ісік клеткаларында сукцинатдегидрогеназа ферментінің белсенділігі жоғары екенін білдіреді [9, p. 4]. DU145 пен PrEC клеткалары арасындағы айырмашылықтары олардың митохондрия мөлшеріне, тыныс алу ферменттерінің санына және олардың төменгі тотығу белсенділігіне [9, p. 1-13] бұл жұмыста, айқын көрінетін респирометриялық сигналдарды алу үшін қалыпты клеткалардың шамамен үш есе үлкен мөлшері пайдаланылды. DU145 клеткаларды 40 нМ FCCP әлсіз белсендіру митохондриялардағы электрон тасымалдау сыйымдылығын арттырды және pH 6,8 сукцинат одан әрі тыныс алуды pH 7,4 110%-бен салыстырғанда 134%-ға дейін жоғарылатты. Керісінше, тыныштық күйде DU145 ісік клеткаларына (37,4 ± 3,7 пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клетка) қарағанда тыныс алу белсенділігі төменірек PrEC қалыпты қуық асты безінің эпителиалды клеткалары (8,3 ± 1,6 пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клетка), FCCP белсендіруден кейін сукцинатпен толықтыруларына дейін тыныс алу қарқыны 14,7 ± 2,9 пмоль $O_2$/с/$10^6$ клетка мәндерімен және 15,4 ± 3,0 пмоль $O_2$/сек/$10^6$ клетка сукцинатпен толықтыруларынан кейін өте төмен жауап көрсетті (4-кесте). Сукцинат қатысында PrEC клеткалардың FCCP белсендірілген тыныс алу пайызы pH 6,8 104% және pH 7,4 101% құрды және бұл айырмашылық статистикалық маңызды емес деп есептелді (28Г-сурет).

Қарастырылған тәжірибелерде II кешенге тәуелді тыныс алудың максималды белсенділігін бағалау үшін сукцинаттың мөлшерін ұлғайту арқылы клеткалар титрленді және pH 7,4 жағдайында сукцинаттың DU145 клеткалардың оттегіні тұтыну қарқынына ешқандай әсері байқалмады (30А-сурет). Бірақ ацидоз кезінде II кешенді-жанама тыныс алуының біртіндеп ұлғайғаны байқалды (30Ә-сурет). Сукцинаттың тасымалдануы тек қышқыл жағдайда ғана болды. Ал бұл сукцинаттың цитозолға жеткізілуі тасымалдаушы механизм арқылы жүретінін көрсетеді. Мұндағы инкубация жағдайлары 29-суреттегі түсіндірмемен бірдей. Глутамат (глутамин қышқылы) және малат (алма қышқылы) қатысында клеткаларда FCCP белсендіруден кейін тыныс алу қарқынының ешқандай жоғарылауы болмады. Дигитонин көмегімен клетка мембранасының өткізгіштігін өзгерту сукцинаттың жаппай сіңірілуін тудырды және тыныс алу қарқынының тез өсуіне алып келді. Бірақ көп ұзамай тыныс алу қарқыны клеткаішілік ортаның бұзылуының нәтижесінде төмендеді. 30А- және 30Ә-суреттердегі ұқсас мәліметтер, I кешен ингибиторы ротенонмен (1 мкг/мл) алдын ала өңделген және сукцинат арқылы ынталандырылған клеткаларда алынды (30Б-, 30В-сурет). 1 мкг/мл ротенонмен I кешен-жанамаланған тыныс алуын тежеуінен кейін субстраттарды титрлеуіне ұқсас нұсқаулық қолданылды. Айта кететін жағдай, қышқыл буферде ротенонмен тежеуден кейін FCCP тыныс алудың айқын белсенуін тудырмады, бірақ клеткалар сукцинатты тасымалдауға қабілетті болды.




А, Ә. DU145 клеткалардың сукцинаттың (Suc) біртіндеп ұлғайған мөлшерлерімен титрлеуі. Б, В. I кешен ингибиторы ротенонмен (1 мкг/мл; Rot) алдын ала өңделген, сукцинат қосылған клеткалардың тыныс алуы. 40 нМ FCCP белсендірілгеннен кейін клеткалар сукцинаттың мөлшерін ұлғайту арқылы арттырды. Дигитонин көмегімен клетка мембранасының өткізгіштігін өзгерту сукцинаттың жаппай сіңірілуін тудырыртты және тыныс алу қарқынының тез өсуіне алып келді.

Сурет 30 – DU145 клеткалардың II кешенге тәуелді тыныс алу субстраттарын титрлеу нәтижелері




Сукцинат тасымалдау кинетикасы сукцинат концентрациясымен салыстырғанда ең жоғарғы дигитонин-стимуляцияланған тыныс алу пайызы түрінде ұсынылған. Ағын ең жоғары сукцинат-жанама тыныс алу қарқынының пайызы ретінде көрсетілген тасымалдауыштың белсенділігі болып табылады. Рот – ротенон, Диг – дигитонин. max – максималды. Мәндер орташа ±SEM ретінде көрсетілген (n= 9).

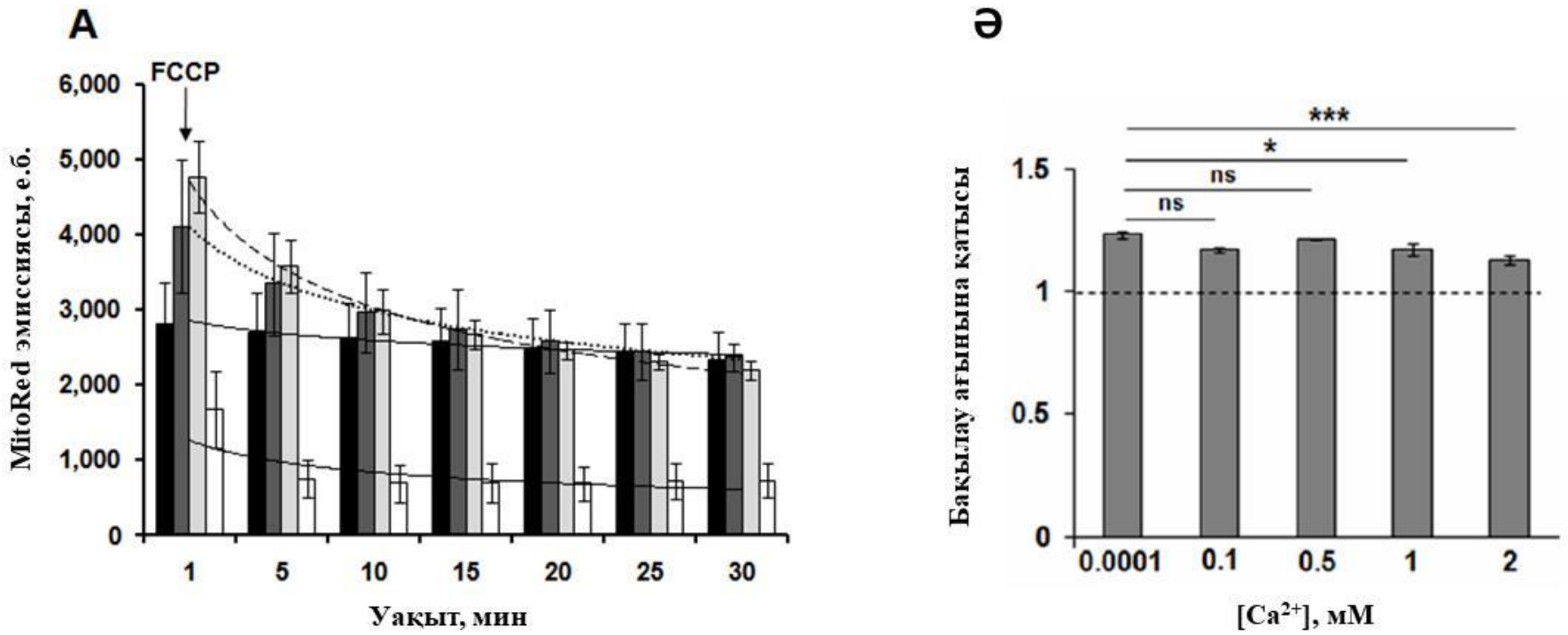
Сурет 31 – Қышқыл ортада DU145 клеткаларының сукцинат тасымалдау кинетикасы

Бұл әсер pH 7,4 жағдайында байқалмады. NADH-дегидрогеназа кешенін ротенонмен тежеу арқылы электрон тасымалдауының жалпы сыйымдылығының төмендеуі, дигитонинмен индукцияланған жоғары тыныс алу қарқындарынан көрініп тұрғандай сукцинат-жанама тыныс алуының төмендеуіне әкелді (30Ә-, 30В-, 31А-суреттер). Қышқыл ортада DU145 клеткалардың плазмалық мембранасы арқылы тасымалдау механизмі, одан әрі экзогенді сукцинатты сіңіруі үшін $K_m$ (Михаэлис тұрақтысы) анықтау кезінде қосымша сипатталды [296]. Таңдалған жағдайларда $K_m$ мәндері ротенон бар және жоқ кезде сәйкесінше, 1,73 ± 0,33 мМ және 3,25 ± 0,5 мМ көрсеткіштерін көрсетті. Бұл I кешенді тежеуі кезінде тасымалдаушымен сукцинаттың сіңірілуіне жақсы ықпал ететінін көрсетеді (31А-сурет).

Қышқыл pH көптеген клеткалар үшін, соның ішінде қатерлі ісіктер үшін де улы болып келеді [297]. Алайда, ісік клеткалары сәтті түрде олардың жағдайына бейімделіп, оларды өздерінің клеткалық активтілігі үшін пайдаланса, бұл олардың дәрілік препараттарға тұрақтылығын арттыруы немесе одан әрі агрессивті жағдайға әкелуі мүмкін. Сондықтан ісіктердің pH жағдайы мен протон-сезімтал жүйесінің шектемесін тежеу, препараттардың тиімділігін арттырып қана қоймай, метастазданудың алдын алуда маңызды болып табылады. Ісіктерді зерттеудегі соңғы жетістіктер ісік микроортасында ісіктердің метаболикалық қайта бағдарламалануындағы үлесін тапты. Қуық асты безі ісіктері өздерінің жоғары тотыға фосфорлануын ұстап тұру үшін өздерінің метаболизмін қайта реттей алады, сөйтіп қолайлы ісік микроортасына ықпал етеді [295, б. 131].

### 3.2.2 Қуық асты безі ісік клеткаларында сукцинаттың тотығуына фтор карбонилцианид фенилгидразон (FCCP) мен кальций мөлшерінің әсерлерін бағалау

Трипан көк бояғышын ескермеу әдісімен талдауы DU145 клеткалар FCCP-мен өңделмеген 98%+2,7 клеткалармен салыстырғанда FCCP кейін өздерінің өміршеңдігін 97,5%+1,5 сақтайтынын көрсетті. Бұл қолданылған FCCP мөлшерлері клеткалардың плазмалық мембранасын төмендетпейтіндігін дәлелдейді. Одан әрі FCCP-мен өңделген клеткалардың тұрақтылығын тексеру үшін оларға 20 нМ және 40 нМ FCCP қосылғаннан кейін митохондриялның мембраналық потенциалына сезімтал *MitoRed* бояуын қолдану арқылы митохондриялардың мембраналық қабілеті өлшенді. 32А-сурет таңдалған FCCP мөлшерінің митохондрияның мембраналық потенциалын төмендетпейтінін көрсетеді, бірақ эндогенді субстраттар қорының таусылуына мүмкіндік беріп, тыныс алуын қарқындатты [298]. Бұл тәжірибеде оң бақылау ретінде клеткалар 2 мкМ FCCP өңделді, FCCP бұл мөлшері митохондриалардың мембраналық потенциалын жояды (32А-суретте ақ бағаналармен көрсетілген).




А. DU145 клеткалары ΔΨm сезімтал *MitoRed* бояуымен алдын ала инкубацияланды. *MitoRed* фонының қарқындылығы қара бағаналармен көрсетілген. Клеткалардың тотығу белсенділігін арттыру үшін, олар 20 нМ (қою сұр түсті бағаналар) және 40 нМ (ақшыл сұр түсті бағаналар) FCCP өңделді және 15-20 минуттан кейін өзінің бастапқы деңгейіне дейін қайта қалпына келді. Оң бақылау ретінде клеткалар 2 мкМ FCCP өңделді (ақ бағаналар). Ә. DU145 клеткалардың сукцинат тотығуының белсенділігі кальцийдің әртүрлі концентрациялары бар pH 6,8 буферінде өлшенді. Клеткаларды 40 нМ FCCP алдын ала белсендіру нұсқаулығы қолданылды. FCCP-белсендірілген тыныс алу үшін бақылау ағынының қатынасы нормаға келтірілді. Мәндер орташа ± SEM ретінде көрсетілген (n=8).
*p < 0.01, ***p < 0.001, ns – айтарлықтай емес.

Сурет 32 – FCCP өңделген DU145 клетка митохондриясындағы мембрана тұрақтылығын бағалау және клеткадан тыс кальций мөлшерін модуляциялау арқылы сукцинаттың тотығуы

Мембраналық тұрақтылық клеткадан тыс кальций иондарының [299, 300] бақылауында болады, сонымен бірге сукцинат кальций тұздарын қалыптастыруға қабілетті [301]. Тыныс алу буферінде $CaCl_2$ төмен (100 нМ) мөлшері дигитонин өткізгіштігінен кейін жоғары кальций концентрациясы арқылы митохондрияның зақымдануын болдырмау үшін құрастырылған тәжірибелер үшін таңдап алынды. Сондықтан қышқыл pH жағдайында клеткалармен сукцинаттың тотығу қарқынына клеткадан тыс кальцийдің әртүрлі концентрациясының әсерін бағалау маңызды болды. Негізгі тыныс алу 37,4 ± 3,7 пмоль/сек/$10^6$ клетка деңгейінде қалып, 100 нМ (клетка ішіне жақын) және 2 мМ (клетка сыртына жақын) диапазон аралықтарындағы кальций иондарының концентрацияларымен клеткадан тыс кальций концентрацияларының өзгерістеріне сезімтал емес болды. Кальцийдің төмен концентрацияларын қосқан кезде, атап айтқанда 100 нМ, 0,1 және 0,5 мМ, сукцинат тотығу қарқыны ұқсас болды. Бұл кальций иондарының плазмалық мембрананың сукцинатты тасымалдаушысының белсенділігіне және CaCl2 төмен концентрацияларында митохондриялардың тыныс алуына айтарлықтай әсерінің жоқтығын көрсетеді. Алайда, 1 және 2 мМ қатысында, яғни клеткадан тыс кальцийдің физиологиялық жағдайға жақын концентрациясында DU145 клеткаларымен сукцинатың тотығу қарқыны сәл баяу болды, атап айтқанда pH 6,8 жағдайында тыныс алу буферінде 117% (1 мМ) және 113% (2 мМ) $CaCl_2$ салыстырғанда, 123% астамы FCCP белсендірілген тыныс алуы бойынша 100 нМ кальций кезінде болды. 32Ә-суретте FCCP-белсендірілген тыныс алу үшін нормаланған ағынының бақылау қатынасының мәндері ұсынылған. Мұнда 0,0001 және 0,1 немесе 0,5 мМ $CaCl_2$ қатысында сукцинат тотығу қарқындылығындағы айырмашылығы статистикалық маңызды емес деп көрсетілді [278, p.1671.

Сонымен, ісік микрортасында кальций иондарының төмендеген деңгейі белгісіз механизм арқылы дикарбон қышқылы тасымалдаушыларының белсенділігін қамтамасыз етеді. Осы зерттеу жұмысының тәжірибелерінде құрамында физиологиялық жағдайға жақын кальцийі (1-2 мМ) бар буферді қолдану сукцинат тасымалдануының шамалы төмендеуіне әкелді. Ал $CaCl_2$ 0,5 мМ және одан да төмен концентрациялары сукцинаттың белсенді сіңірілуіне көмектесті. Бұл нәтиже клетканың клеткаға адгезиясының төмендеуіне және ісіктің метастазданууына ықпал ете алатын ісік ортасында бұрын ұсынылған жергілікті кальций тапшылығымен сәйкес келеді [219, p. 3687-3692; 220, p. 529-535]. Энергетикалық субстраттың ағындары митохондриялық жүктемені және олардың антиапоптоздық потенциалын реттейді [9, p. 8-9]. Сонымен қатар, ҮҚЦ метаболиттері басқа да қатерлі трансформация процестеріне ықпал етеді [302]. Сукцинат және фумарат гипоксиялық және оттексіз (аноксиялық) жағдайлардағы ісіктердің өмір сүру механизмдері үшін маңызды болып табылатын гипоксия-индукцияланған транскрипция факторы-1α (HIF-1α)-байланысқан онкогенді сигнал беру жолдарын тұрақтандыратыны белгілі [303, 304]. Сондай-ақ, цитрат та маңызды гипоксиялық клеткалық өсу метаболиті және мембраналық тұрақтандыру арқылы ісік клеткалары өлімінің

сезімталдығын азайтатын митохондриялық холестерин мөлшерінің күшейткіші болып табылады [305].

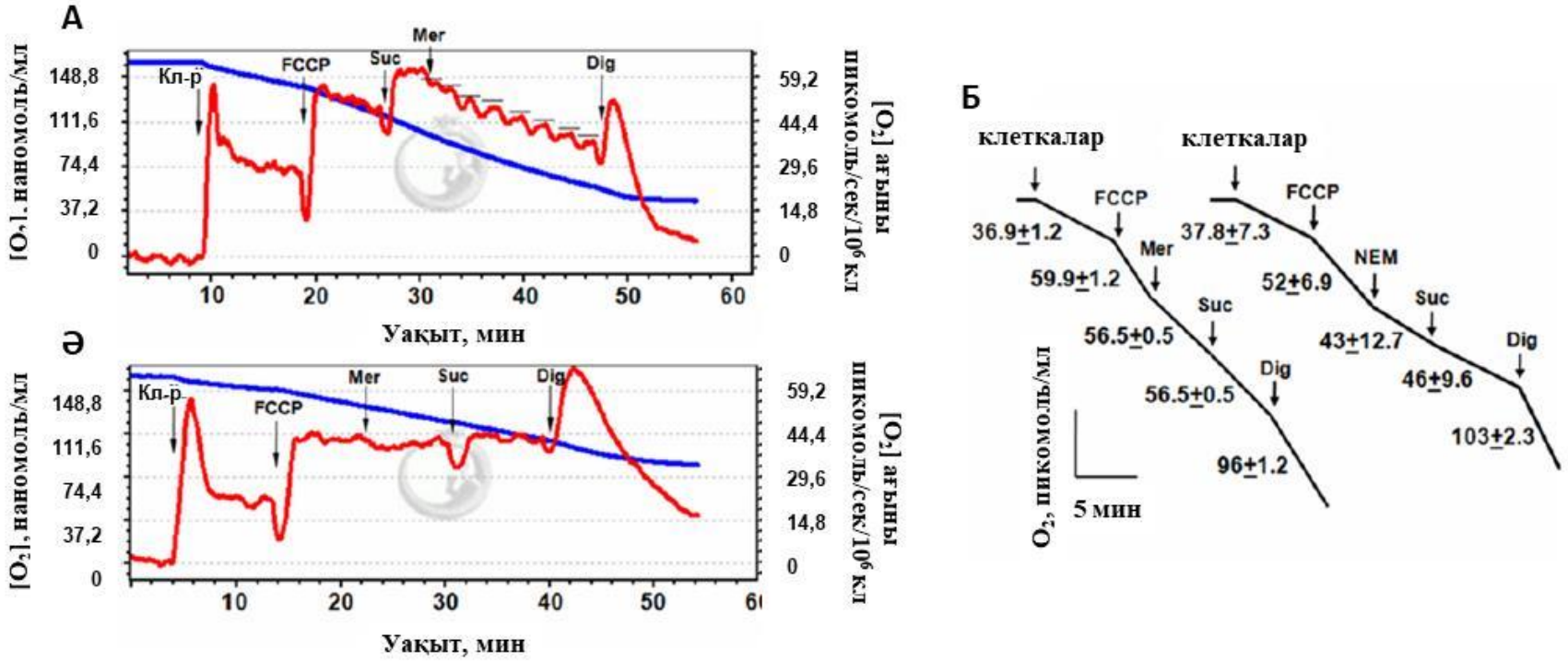
3.2.3 Сукцинат сіңірілуінде дикарбон қышқылы тасымалдаушысы рөлінің ингибиторлық талдауы

Бұл жұмыста сукцинаттың тасымалдауында дикарбон қышқылдарының $Na^+$-тәуелді тасымалдаушыларының рөлін растау үшін дикарбон қышқылы тасымалдаушыларының арнайы ингибиторлары, яғни белоктың сульфгидрилды топтарымен өзара байланысуы арқылы өздерінің әсерлерін көрсететін мерсалил және N-этилмалеимидті (NEM) қолдану арқылы ингибиторлық талдауы пайдаланылды.

3ЗА- және 3ЗӘ-суреттерде мерсалил қатысында DU145 ісік клеткаларының тыныс алуының оксиграфты есептеулері көрсетілген. FCCP алдын ала өңдеу 29-суретте келтірілген нұсқаулық бойынша орындалды. Қысқа тұрақтандыру кезеңінен кейін тыныс алу ферменттері 40 нМ FCCP көмегімен белсендірілді. Клеткалар FCCP-мен әлсіз белсендіруден кейін 10 мМ сукцинатпен белсендірілді. Митохондриялардың интактілігін сақтап тұратын ингибитордың оңтайлы концентрациясын анықтау үшін клеткалар мерсалилдің біртіндеп ұлғайған дозасымен (10, 20, 60, 120, 180, 240, 300 және 360 мкМ) титрленді. Кейіннен, жаппай тасымалдаушы-жанама емес сукцинат ағынын тудыру үшін 10 мкМ дигитонин қосылды. Мерсалилдің 250 мкМ таңдалған дозасы клеткаларға сукцинат және дигитонин қосу алдында қолданылды [278, p. 1671-1672].

Мерсалилдің біртіндеп ұлғайған дозалары қуық асты безінің DU145 ісік клеткаларының сукцинат арқылы ынталандырылған тыныс алуын тоқтатты (3ЗА-сурет). Ал сукцинат алдында қосылған мерсалил сукцинаттың тотығуын болдырмады және DU145 ісік клеткасы мембранасының дигитониндік өткізгіштігі ғана сукцинаттың цитозолға енуіне мүмкіндік берді, сондай-ақ, кешен II-тәуелді тыныс алуын тудырды (3ЗӘ-сурет).

Дигитонин қосу кезінде тыныс алудың артуы осы тәжірибеде митохондриялардың интактілігін (зақымдалмауын) растады. Алайда перфорацияланған мембрана арқылы клеткадан тыс буферден мерсалилдің енуі митохондриялық дикарбон қышқылы тасымалдаушыларының тежелуі салдарынан тыныс алу қарқынының айқын төмендеуіне әкелді (3ЗА- және 3ЗӘ-сурет). DU145 ісік клеткаларының сукцинат сіңіруіне екі ингибитордың да, мерсалил және N-этилмалеинимидтің әсері жайлы мәліметтері 3ЗБ суретте көрсетілген. Ингибиторлар қатысында оттегі тұтыну қарқынының өзгеруінің сандық деректері 4-6 тәуелсіз тәжірибелерден орташа мәннің стандарттық қатесі (± SEM) ретінде ұсынылды. 250 мкМ мерсалилге (Mer) балама болып табылатын, дикарбон қышқылы тасымалдаушысының NEM ингибиторы 120 мкМ концентрациясында қолданылды.




Қысқа тұрақтандыру кезеңінен кейін, тыныс алу ферменттері 40 нМ FCCP көмегімен белсендірілді. А. Әлсіз ынталандырудан кейін, клеткалар 10 мМ сукцинатпен (Suc) белсендірілді. Митохондриялардың интактілігін сақтап тұратын ингибитордың оңтайлы концентрациясын анықтау үшін, клеткалар мерсалилдің біртіндеп ұлғайған дозасымен (10, 20, 60, 120, 180, 240, 300 және 360 мкМ) титрленді. Кейіннен, жаппай тасымалдаушы-жанама емес сукцинат ағынын тудыру үшін 10 мкМ дигитонин (Dig) қосылды. Ә. Мерсалилдің 250 мкМ таңдалған дозасы клеткаларға сукцинат және дигитонин қосу алдында қолданылды Б. Ингибиторлар қатысында оттегі тұтыну қарқыны өзгеруінің сандық деректері орташа ± SEM мәні ретінде ұсынылды. (n = 6). 250 мкМ мерсалилге (Mer) балама болып табылатын, дикарбон қышқылы тасымалдаушысының ингибиторы NEM 120 мкМ концентрациясында қолданылды.

Сурет 33 – Қышқыл буферде DU145 қуық асты без ісік клеткалары арқылы сукцинаттың сіңірілуіне ингибиторлардың әсері

Келесі ретте, қуық асты безі ісік клеткаларымен сукцинаттарды сіңіру протонофордың төмен концентрацияларымен (20-40 нМ FCCP) ынталандыру арқылы «ашыққан» жағдайға дейін жеткізілген DU145 ісік клеткаларында зерттелді. FCCP арқылы белсендірілген тыныс алу негізінде эндогендік тыныс алу метаболиттерінің сарқылуын pH 6,8 ортасының тыныс алу буферінде экзогенді дикарбон қышқылы сукцинатының белсенді тотығуын байқауға мүмкіндік берді. Бұл құбылыс pH 7,4 тыныс алу буферінде байқалмаған болатын. Дикарбоксилатты тасымалдау электрогенді және протондалған күйіндегі сукцинат $Na^+$ градиенті (ішке бағытталған) үшін ғана тасымалданады [306].

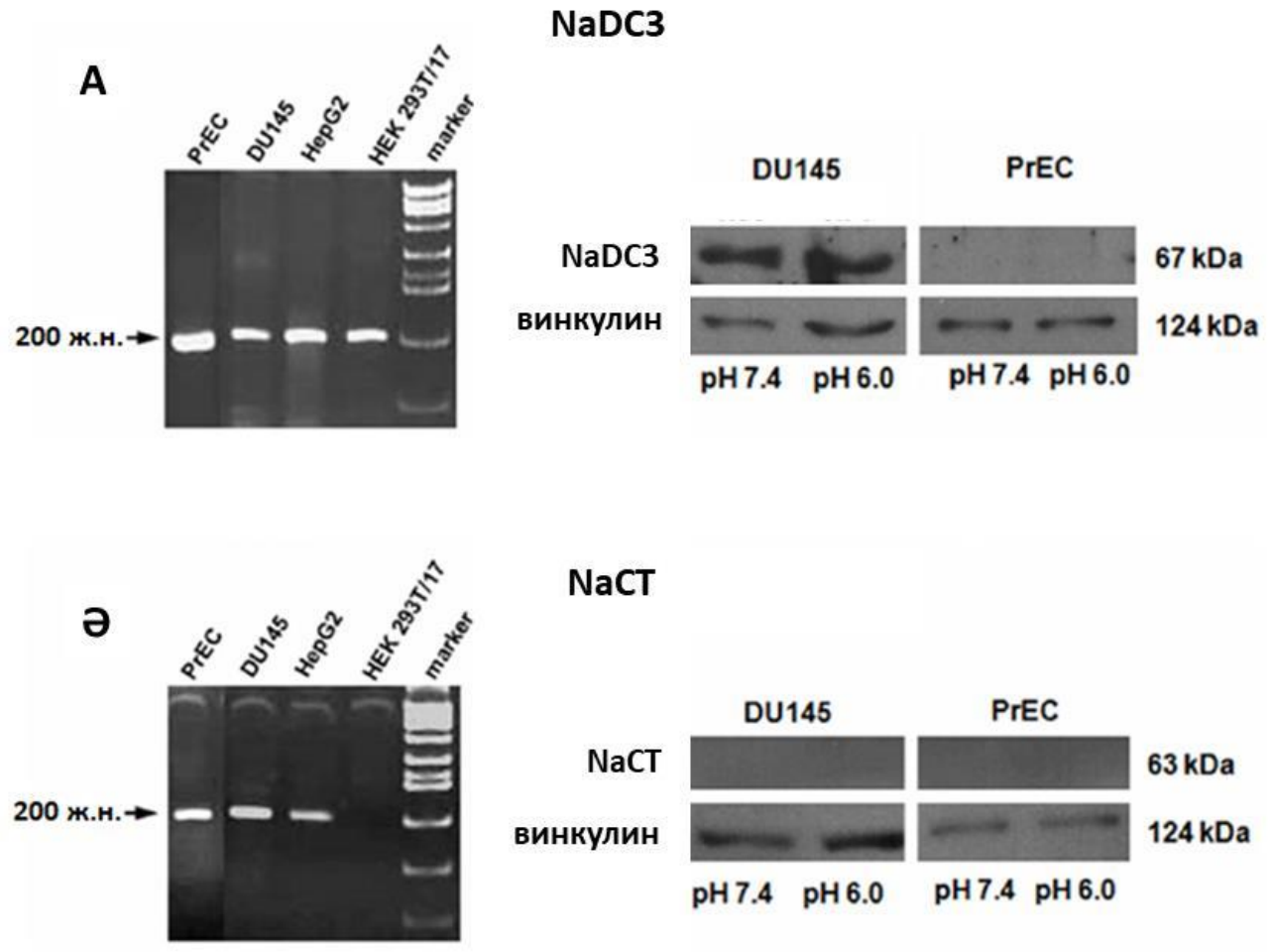
Мерсалилдің сульфгидрилді агенттерін және NEM ингибиторын қолдану осы жұмыс тәжірибелерінде сукцинаттың сіңірілуіне $Na^+$-тәуелді дикарбоксилат тасымалдаушысы септігін тигізетіні расталды (33-сурет) [232, p. 122; 307 Екі ингибитордың ұқсас клеткалардың тыныс алуына тосқауыл болатындығы көрсетілді (33Б-сурет). Сукцинат қатысында ингибиторлар әсерінен кейін ешқандай да тыныс алу арттырулары байқалмады. Зерттеу жұмысының мәліметтері ацидоз кезінде дикарбоксилат тасымалдау қандағы ісік клеткалары және қоршаған ұлпалары арқылы ҮҚЦ метаболиттерінің сіңірілуі үшін қолайлы екенін көрсетті.

### 3.2.4 Қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткаларында дикарбон қышқылы тасымалдаушыларының экспрессиясы

Дикарбоксилаттардың $Na^+$-тәуелді тасымалдануы бүйрек мембраналары үшін жақсы сипатталған [244, p. 5459; 301]. Бауыр немесе бүйрек клеткалары сияқты физиологиялық тұрғыда сұйықтықтың реабсорбциясына қатыспайтын қуық асты безі клеткаларында дикарбон қышқылы тасымалдаушыларының экспрессиясы  бағалау маңызды. Бұл жұмыста белгілі NaDC1, NaDC3 және NaCT тасымалдаушыларының транскрипт деңгейі ПТР (полимеразалық тізбектік реакция әдісі) көмегімен және тиісті белоктардың деңгейі Вестерн-блот талдауы арқылы зерттелді (34А-, 34В-сурет).

NaDC3-тің мРНК экспрессиясы қуық асты безінің DU145 ісік және PrEC қалыпты клеткаларында анықталды. Ал NaDC1 изоформасы қуық асты безі клеткалық линияларында немесе оң бақылауларда анықталмады. Салмағы 200 ж.н. NaDC3 үшін дәл сондай амплификация өнімі бауыр (HepG2) және бүйрек (HEK293T/17) клеткаларында көрінуі керек және ол үшін оң бақылау ретінде қолданылды [308, 309]. Вестерн-блот талдауынан NaDC3 белогы DU145 ісік клеткаларында ғана анықталғанын, ал PrEC қалыпты клеткаларында болмағанын көрсетті. Денситометрия талдауы клеткаларды жинау алдында 10 күн бойы pH қышқыл орта жағдайында ұсталған ісік клеткаларындағы тасымалдаушы белоктардың айқындалуы физиологиялық pH ерітінді ортасында өсірілген клеткаларға қарағанда 29% төмен болатыны анықталды. Бұл процесті қышқыл ортада тасымалдаушының жоғары функционалды активтілігі үшін оның толықтыру механизмінің болуымен түсіндіруге болады. Дикарбонды тасымалдаушылар түріне жататын белоктың бірі, атап айтқанда,

$Na^+$-тәуелді цитратты тасымалдаушысы (NaCT), сондай-ақ, белгілі бір деңгейде сукцинатты тасымалдау мүмкіндігіне де ие болады [310]. Бұл зерттеу жұмысында HEK293T/17 бүйрек клеткаларынан басқа, барлық тәжірибе жасалған клеткалық линияларда NaCT мРНК экспрессиясын анықталды. Нәтижесінде, мұнда іріктелген праймерлер қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткаларында NaCT мРНҚ экспрессиясын анықтауға қабілетті екені дәлелденді. Алайда, келесі ретте Вестерн-блот талдау әдісі зерттелген қуық асты безі клеткаларының барлығы да $Na^+$-тәуелді цитратты тасымалдау экспрессиясын көрсетпегенін айқындады (34В-сурет). Тасымалдаушы экспрессиясының деңгейі оның функционалдық мүмкіндіктерінің бақылауында болатынын көрсетті [278, p. 1672-1673].




NaDC3 (А) және NaCT (Ә) тасымалдаушыларының КТ-ПТР және Вестерн-блот талдаулары. Винкулин ішкі бақылау ретінде қолданылды.

Сурет 34 – Қуық асты безінің ісік және қалыпты клеткаларында дикарбон қышқылы тасымалдаушылары транскрипттерінің және белок синтезінің талдауы

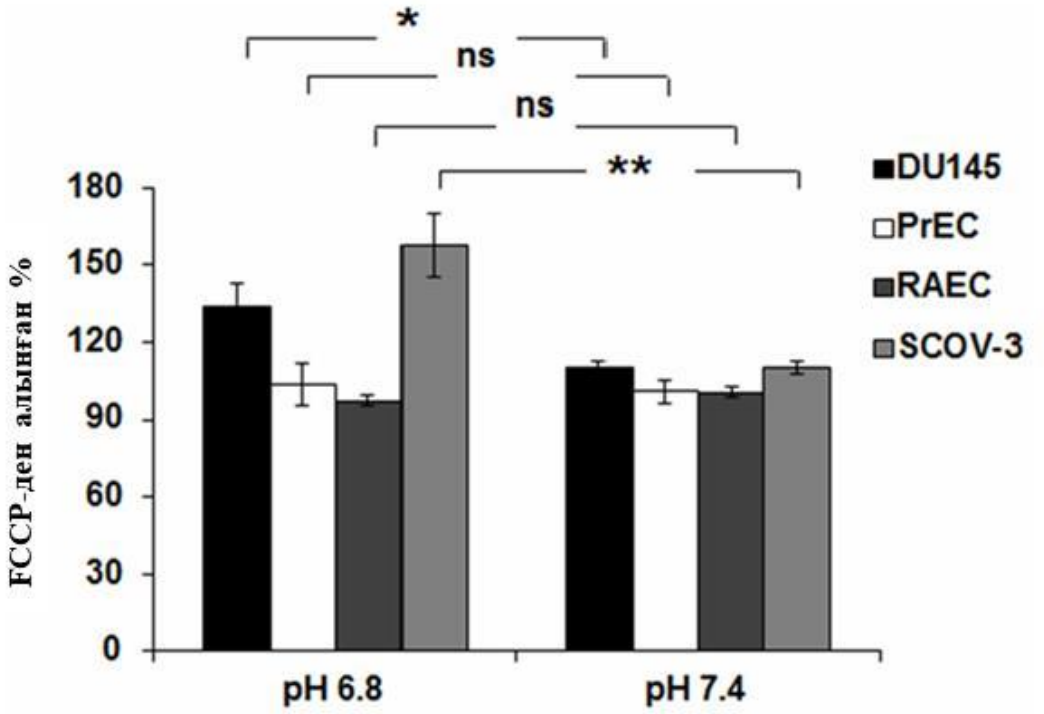
*Mycielska* әріптестерімен қуық асты безі ісік клеткалары белгілі плазмалық мембрана тасымалдаушысынан өзгешеленетін цитрат тасымалдаушысы изоформасына ие болу мүмкіндігін ұсынды [249, p. 396-397]. Ал жоғарыда жүргізілген тәжірибелер негізінде қатерлі трансформациялар (өзгерістері) салдарынан ісік клеткалары онкогенді микроорта қышқылданғаннан кейін белсенетін NaDC3 белогының тасымалдаушыларына ие болатынын болжауға болады.

Сонымен, жоғары сәйкестігі бар NaDC3 транскрипттерінің экспрессиясы, қуық асты безінің ісік және қалыпты клеткаларында көрсетілді. Бұл бауыр мен бүйрек клеткалары үшін басқа зерттеушілермен көрсетілген нәтижелерге ұқсас болды [308, p. 3422-3424; 309, p. 1028] (34А-сурет). Сондай-ақ NaDC3 белогы қуық асты безі ісік клеткаларында ғана анықталды. Қуық асты безінің эпителий қалыпты клеткалары тасымалдаушы белоктарды түзбеді. Бұл олардың физиологиялық қажетсіздігіне байланысты болуы мүмкін. Тасымалдаушы экспрессиясының деңгейі оның функционалдық мүмкіндіктерінің бақылауында болатыны көрсетілді. Физиологиялық ортада (pH 7,4) өсірілген DU145 клеткалары, олардың функционалдық тыныштық күйіне толық бөлімделуі ретінде тасымалдаушының жоғары деңгейін өндірді. Керісінше, сукцинатты белсенді сіңіруге қабілетті тасымалдаушылардың экспрессиясы қышқыл ортада өсірілген клеткаларда 29%-ға төмен болды (34А-сурет). Қуық асты безінің ісік және қалыпты клеткаларында да NaDC1 белогы үшін ешқандай транскриптер анықталмады. Керісінше, белгілі NaCT тасымалдаушысы мРНҚ транскриптері ретінде ұсынылды. Бірақ бұл зерттеу жұмысында қуық асты безінің ісік немесе қалыпты клеткаларында тиісті тасымалдаушы белоктары табылмады (34В-сурет) [278, p. 1675].

### 3.2.5 Қышқыл орта жағдайында әртүрлі клеткаларда сукцинаттың сіңірілуін салыстырмалы зерттеу

Бұл тәжірибеде қуық асты безінің DU145 ісік және PrEC қалыпты клеткаларымен қатар, басқа да клеткалық линиялар, атап айтқанда аналық безі ісік эпителий клеткаларының (SKOV-3) және егеуқұйрықтың аорталы эндотелий клеткаларының (RAEC) қышқыл орта жағдайында сукцинаттың сіңірілуі зерттелді (3-кесте). Нәтижесінде DU145 қуық асты безінің және SKOV-3 аналық безінің ісік эпителий клеткаларында ғана қышқыл орта жағдайында сукцинат сіңірілуінің артатыны анықталды. 35-суретте физиологиялық және қышқылды орта жағдайында сукцинат қатысында әртүрлі клеткалық линиялардың FCCP-белсендірілген тыныс алу пайызы мәндерінің салыстырмалы деректері келтірілген. SCOV-3 аналық без ісік клеткаларының FCCP-белсендірілген тыныс алу пайызы сукцинат қосу кезінде pH 6,8 жағдайында 158% өсті. Ал pH 7,4 жағдайында мұндай көрініс байқалмады. Осылайша, аналық безі ісік клеткалары қуық асты безі ісік клеткалары сияқты ацидоз жағдайында экзогендік сукцинатты тасымалдауға қабілеттілігін көрсетті. Сукцинат қышқыл буфер жағдайында қуық асты безінің қалыпты клеткаларына ұқсас (pH 6,8 104% және pH 7,4 101%) егеуқұйрықтың аорталы

эндотелиалды клеткаларының (RAEC) тыныс алуын да белсендірмеді, яғни pH 6,8 97% және pH 7,4 101% көрсететті (35-сурет). Сонымен, осы тәжірибеден сукцинаттың сіңірілуі - ісік клеткаларына тән ерекшеліктердің бірі екені анықталды [278, p. 1673].




Инкубация жағдайлары 29-суреттегі түсіндірмемен бірдей. Тыныс алу ферменттезі 40 нМ FCCP көмегімен белсендіріледі. Содан соң 10 мМ сукцинат қосылды. FCCP белсендірілген оттегі тұтыну қарқыны пайызының мәндері орташа ± S.E.M. ретінде ұсынылған. (n = 8). *p < 0,05, **p < 0,005, ns – айтарлықтай емес.

Сурет 35 – pH 6,8 және 7,4 жағдайларында әртүрлі клеткалық линияларда сукцинаттың тотығуы

Сонымен, бұл зерттеуде ұсынылған деректер DU145 қуық асты безі ісік клеткаларына ұқсас SKOV-3 аналық безі ісік клеткалары да қышқыл жағдайда сукцинатты сіңіретінін көрсетті. Бұл қышқыл микроорта жағдайымен туындаған сукцинаттың жоғары сіңірілуі, плазмалық мембрананың $Na^+$-тәуелді дикарбоксилатты тасымалдаушысы механизмі арқылы метаболиттерді тасымалдау қабілетіне ие болатын ісік клеткаларының ерекшелігі болып табылатындығы осы жұмыстың гипотезасын растайды.

3.2.6 Қуық асты безінің қалыпты клеткаларында ісік клеткаларымен салыстырғандағы айқын айқаспалы кедергілерінің механизмдері

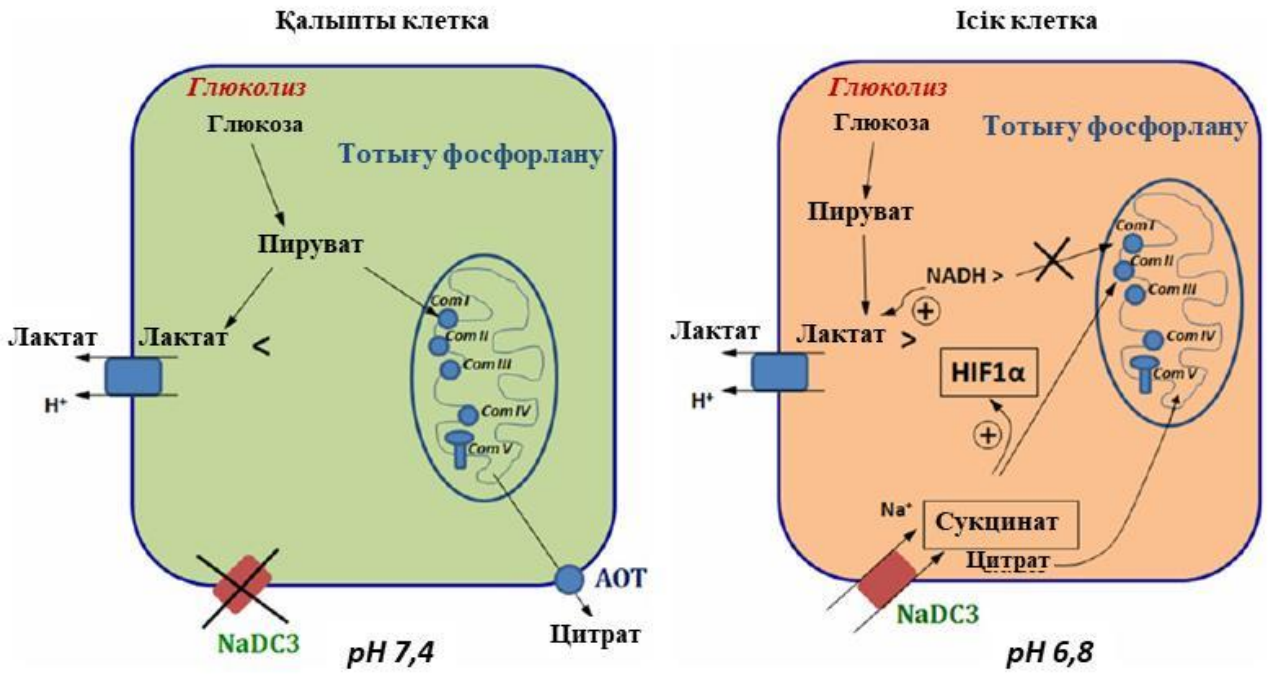
*Otto Warburg* алғаш рет канцерогенді өзгерістер мен биоэнергетикалық бұзылыстар арасындағы байланысты көрсеткеннен бастап аэробты гликолиз процесі ісік клеткаларының әмбебап қасиеті ретінде қаралды. Алайда соңғы он жылда белсенді гликолиз ұлпаға байланысты болатыны және көптеген ісіктер

митохондриялар арқылы жылдамдатылған тотыға фосфорлануымен өздерін белсендіретіні көрсетілген [9, p. 7; 227, p. 4047-4050; 311, 312]. Гликолиздің жоғары қарқынын сақтай отырып, ісік клеткалары энергияны өндіруде, биосинтез үшін де [313] ісік патологиясының метаболикалық шығу тегін көрсететін [314] басқа да энергия жолдарын пайдалана алады. Митохондрияның генетикалық және функционалдық икемділігіне байланысты, ісік клеткалары метаболикалық икемді, оттегі мөлшерінің көп болуына тәуелді емес, сонымен қатар олардың апоптозға төзімді жылдам өсуі үшін қажетті әртүрлі энергия түрлерімен өздерін қанағаттандыруға қабілетті келеді [209, p. 4209-4214]. Сонымен қоса, аталған ісік клеткалары энергия көзі мол қоректік заттар арқылы өздерінің белсендірілетін митохондриялық қайта бағдарлану негізінде микроортасын қалпына келтіру қабілетіне ие бола алады [315]. Тәжірибелік үлгі мен шарттарды әзірлеу кезінде клетканың клеткамен және клетканың органдармен байланысқан өзара клеткалық процестерді есепке алу факторы жиі жойылады. Сондықтан, оның күрделігіне қарамастан, гипоксия, қышқылдық, метаболиттердегі шектеулер, иондық теңгерімсіздік және сол сияқты қоршаған орта өзгерістерінің әсерін ескеру қажет. Бұл жұмыста ісік клеткалары онкогенді сигнал беру үшін өздерінің қышқыл микроортасынан және жергілікті кальцийі бар модуляциялардан пайдасын қалай шығаратынын және қоршаған ұлпалардан энергияға бай метаболиттерді тұтынуға өздерінің паразиттік қабілеті үшін олар қандай механизмдерді қолданатыны жайлы мәселелер қарастырылды. Үшкарбон қышқылы циклінің (ҮҚЦ) [316] және тыныс алу ферменттерінің функционалдық белсенділігін зерттеуі ісік дамуындағы зат алмасу өзгерістерінің рөлі жайлы көзқарасын өзгертті және ісіктің метаболикалық ауруларының көптеген сипаттамаларына ие екенін көрсетті [317]. Қуық асты безі ісік клеткаларының және басқа да типті ісік клеткалары плазмалық мембраналарының дикарбоксилатты тасымалдаушылары жайлы зерттеулер саны өте аз. Қуық асты безі ісік клеткаларының плазмалық мембранасының дикарбоксилатты тасымалдауышысының белсенділігі клеткадан тыс pH арқылы қатты модуляцияланғаны анықталды. Қышқыл онкогенді микроортасында қуық асты безінің қалыпты клеткаларымен салыстырғанда қуық асты безінің ісік клеткаларында сукцинаттың тасымалдану механизмі осы зерттеудің негізгі тақырыбы болды.

Ісік клеткалары өздерінің энергиямен жабдықтауын энергетикалық баламаларымен өзгертеді және түрлі энергетикалық жолдардан, атап айтқанда гликолиз, тотыға фосфорлану, β-тотығу, глутаминолиз және пентоза-фосфатты жолынан, олардың қол жетімділігі бойынша ауыстырып қосылатын субстраттары арқылы пайдасын шығарады. Баламалы энергия ресурстарына қолжетімділігі ісік клеткаларының кез келген стресс жағдайында тұрақты зат алмасу белсенділігін қамтамасыз ету кезінде икемділігін көрсетеді.

Зерттеу жұмыстарында қуық асты безі ісік митохондрияларының цитрат синтетаза ферментімен [318] бірге НАДН және сукцинатдегидрогеназа ферменттерінің [9, p. 1] тыныс алу белсенділігі 2-ден 7 есеге дейін жоғарылата

алатын метаболикалық белсенді екені көрсетілді Сонымен қатар, Панов (*Panov*) және Орынбаева (*Orynbaeva*) I кешенді тыныс алудың НАДН субстратына ұқсастығы қалыпты қуық асты безі митохондрияларына қарағанда төмен екендігін анықтады [9, p. 1-3]. Бұл өзгеріс ферментативті белсенділікте ісік митохондрияларының I кешен ақауы ретінде емес, керісінше, артық НАДН талап ететін, лактат өндірісінің қарқынына қарай митохондриялардың тыныс алу жүйесінің бейімделу трансформациясы ретінде қарастырылды. Лактаттың ағып шығуы ісік микроортасын қышқылдататын протондармен бірлесіп тасымалданады [212, p. 89]. Бұл маңызды анықталу қуық асты безі ісік клеткалары қышқыл орта жағдайында олардың жоғары тотыға фосфорлануын қамтамасыз ету үшін, клеткадан тыс сұйықтықтарда қол жетімді болатын ҮҚЦ аралық өнімдерін, соның ішінде сукцинат пен цитрат тұтынуға қабілетті болып табылатынын көрсетті. Бұл жұмыстың деректері сукцинаттың мембраналық тасымалдануы және клеткаішілік бөлінуі клетканың метаболикалық қажеттіліктерін қызметтік қолдау үшін орналастырылған механизмі екенін көрсетеді. 36-суретте NaDC3 тасымалдаушысының клеткаішілік сукцинатты сіңіру кезіндегі рөлін ерекшелейтін, қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткаларындағы гликолитикалық және қышқылдану арасындағы ұсынылатын айқас кедергілері көрсетілген.




Қысқартулар: Com I, II, II, IV, V - тыныс алу жүйесінің ферменттері және АТФ-синтаза, АОТ - плазмалық мембрананың органикалық анион тасымалдаушысы, NaDC3 - плазмалық мембрананың натрийге-тәуелді дикарбон қышқылы тасымалдаушысы, HIF1α - гипоксия индукциялаушы фактор 1α.

Сурет 36 – Қуық асты безінің қалыпты клеткаларында ісік клеткаларымен салыстырғандағы екі негізгі энергия өндіруші жолдарының арасындағы айқын айқас кедергілері механизмдерінің сызбанұсқасы

Қышқылдығы мен кальций мөлшерін модуляциялаудан басқа, гиперкалиемия ісік клеткаларының инвазивтілігіне көмектесетін онкогенді микроортасына қатысы бар факторлардың бірі болып табылады [218, p. 784]. Дегенмен, KCl-негіздегі буферде сукцинаттың тасымалдануына және оттегі тұтынудың орташа өзгерістерінің тотығуына $K^+$ иондарының қандай да бір елеулі әсерлері табылмаса да, сукцинат тасымалдануының сыртқы $K^+$ иондарымен қауымдастығының мүмкіндігі жоққа шығарылмайды. Бұған дейін $K^+$ иондарының $Na^+$-тәуелді цитрат қозғалысын тездететіні көрсетілген [319].

Арнайы ингибиторларды қолдана отырып, $Na^+/K^+$-АУФаза ферментінің сукцинат сіңіруге әсерінің потенциалды қатысуы бойынша жасалған зерттеуде 2,5 немесе 10 мкМ глибенкламид DU145 ісік клеткаларының сукцинат арқылы ынталандырылған тыныс алуын айтарлықтай тежемейтінін көрсетті. Алайда, бұл қышқыл орта арқылы $Na^+/K^+$-АУФаза ферментін тежеуіне байланысты болуы мүмкін.

# ҚОРЫТЫНДЫ

Алынған нәтижелер негізінде келесідей қорытындылар жасалды:

1. Төмен температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісі қуық асты безі ісік клеткаларына цитотоксикалық әсер ететіндігі анықталды. Төмен температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісінің цитотоксикалық әсері DU145 ісік клеткаларына қарағанда PrEC қалыпты клеткаларда шамамен 20%-ға төмен, оның плазма дозасына, әсер ету уақытына және клетка типіне байланысты екендігі көрсетілді.

2. Төмен температуралық плазмамен өңдеу метаболиттік белсенді DU145 ісік клеткаларда және метаболиттік пассивті PrEC қалыпты клеткаларда апоптоз процесін тудыратыны анықталды. Ісік клеткаларындағы апоптоз процесі ішкі митохондриялар және сыртқы өлім рецепторлары арқылы жүзеге асатындығы, ал қалыпты клеткаларда аталған процесс сыртқы өлім рецепторлары арқылы ғана жүретіндігі анықталды.

3. Ісік және қалыпты клеткаларға төмен температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісі арқылы әсер ету ондағы митохондриялардың мембраналық потенциалының 30%-ға дейін төмендеуін тудырды. Плазмалық өңдеуден кейін 24 сағат өткеннен соң PrEC қалыпты клеткаларында мембраналық потенциал 70%-ға, ал DU145 ісік клеткаларында 40%-ға дейін қалпына келу процесі болатындығы анықталды.

4. Төмен температуралық плазмамен өңделген PBS ерітіндісі DU145 ісік және PrEC қалыпты клеткаларының тыныс алу қызметтеріне кері әсер ететіндігі анықталды. Сондай-ақ, 24 сағаттан кейін биоэнергетикалық белсенділігі азайған ісік клеткаларына қарағанда қалыпты клеткаларда тотыға фосфорлану процесі қалпына келетіні көрсетілді.

5. Қуық асты безінің DU145 ісік және PrEC қалыпты клеткаларына төмен температуралық плазмамен әсер ету ондағы тотығу стресін тудырады. Мұнда төмен температуралық плазма әсерінен жанама оттегінің белсенді түрлерінің түзілуі митохондриядан тыс жүретіні анықталды.

6. DU145 ісік клеткаларын төмен температуралық плазмамен өңдеу нәтижесінде аталған клеткаларда $Ca^{2+}$ деңгейі өзгермеді. Төмен температуралық плазмамен өңделмеген DU145 ісік клеткаларына АУФ қосқанда кальций иондарының тербелістері пайда болды. Төмен температуралық плазма арқылы өңделген PBS ерітіндісінде инкубацияланған PrEC қалыпты клеткаларына АУФ қосқанда цитозолдық кальций деңгейі бірден жоғарылайтыны, ал DU145 ісік клеткаларында тұрақты күйде артатыны байқалды.

7. Қышқыл микроорта жағдайында DU145 ісік клеткаларында сукцинаттың тотығуы анықталды. Бұл тотығу процесі ортаның pH деңгейінің 6,8 жағдайында жүзеге асатындығы көрсетілді. Сондай-ақ, ісік клеткаларында сукинаттың тасымалдануы NaDC3 тасымалдаушысы арқылы өтетіндігі анықталды.

## ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1 American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2018. – Atlanta: American Cancer Society, 2018. – 76 p.

2 Bray F, Ferlay J., Soerjomataram I., et al. Global Cancer Statistics 2018: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2018. – Vol. 68. – P. 394-424.

3 Mottet N., Bellmunt J., Briers E., et al. European Association of Urology Guidelines on Prostate Cancer // Eur Urol. – 2016. – Vol. 6, № 9. – P. 137.

4 Арзыкулов Ж.А., Сейтказина Г.Д., Игисинов С.И., Махатаева А.Ж., Сейсенбаева Г.Т. Показатели онкологической службы Республики Казахстан в 2007 году (статистические материалы). – Алматы, 2008. – 49 б.

5 Қайдарова Д.Р., Чингисова Ж.К., Шатковская О.В., Сейсенбаева Г.Т., Ажмагамбетова А.Е., Мейрманов Н.О., Жылкайдарова А.Ж. Қазақстан республикасы онкологиялық қызметінің 2016 жылдық көрсеткіштері (статистикалық материалдар). / Д.Р. Қайдарованың редакциясымен, Алматы, 2017. – 91 б.

6 Siegel R.L., Jemal A., Miller K.D. Cancer statistics, 2018 // CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2018. – Vol. 68. – P. 7-30.

7 Hail N. Jr., Chen P., Kepa J.J. Selective apoptosis induction by the cancer chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl)retinamide is achieved by modulating mitochondrial bioenergetics in premalignant and malignant human prostate epithelial cells // Apoptosis : an international journal on programmed cell death. – 2009. – Vol. 14, № 57. – P. 849-863.

8 Ben Sahra I., Laurent K., Giuliano S., Larbret F., Ponzio G., Gounon P., et al. Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells // Cancer research. – 2010.– Vol.70, № 6. – P. 2465-2475.

9 Panov A., Orynbayeva Z. Bioenergetic and antiapoptotic properties of mitochondria from cultured human prostate cancer cell lines PC-3, DU145 and LNCaP // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 8. – P. 1-13.

10 Friedman, G., et al., Applied Plasma medicine // Plasma processes and polymers. – 2008. – Vol. 5. – P. 503-533.

11 Kalghatgi S., Kelly C.M., et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, №1. – P. 1-11.

12 Howlader N., Noone A.M., Krapcho M., Miller D., Brest A., Yu M., Ruhl J., Tatalovich Z., Mariotto A., Lewis D.R., et al. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975–2015. National Cancer Institute. Bethesda, MD. – 2018.

13 Справочник по классификации злокачественных опухолей / под ред Б. Л. Штильмана; пер. с англ.. - Санкт-Петербург: Медакадемия, 2007. - 432 с.

14 Zhang W., Meng Y., Liu N., Wen X.F., Yang T. Insights into Chemoresistance of Prostate Cancer // International journal of biological sciences. – 2015. – Vol. 11, № 10. – P. 1160-1170.

15 Moreau M., Orange N., Feuilloly M.G. Non-Thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination // Biotechnology advances. – 2008. – Vol. 26, № 6. – P. 610-617.

16 De Geyter N., Morent R. Nonthermal plasma sterilization of living and nonliving surfaces // Annual review of biomedical engineering. – 2012. – Vol. 14. – P. 255-274.

17 Lloyd G., Friedman G., Jafri S., Schultz G., Fridman A., Harding K. Gas plasma: medical uses and developments in wound care // Plasma Processes and Polymers. – 2010. – Vol. 7, № 3-4. – P. 194-211.

18 Haertel B., von Woedtke T., Weltmann K.D., Lindequist U. Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing // Biomolecules & therapeutics. – 2014. – Vol. 22, № 6. – P. 477-490.

19 Burts M.L., Alexeff I., Meek E.T., McCullers J.A. Use of atmospheric non-thermal plasma as a disinfectant for objects contaminated with methicillin-resistant Staphylococcus aureus // American journal of infection control. – 2009. – Vol. 37, № 9. – P. 729-733.

20 Fridman G., Brooks A.D., Balasubramanian M., Fridman A., Gutsol A., Vasilets V.N., et al. Comparison of Direct and Indirect Effects of Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma on Bacteria // Plasma Processes and Polymers. – 2007. – Vol. 4, № 4. – P. 370-375.

21 Kostov K.G., Rocha V., Koga-Ito C.Y., Matos B.M., Algatti M.A., Honda R.Y., et al. Bacterial sterilization by a dielectric barrier discharge (DBD) in air // Surface and Coatings Technology. – 2010. – Vol. 204, № 18-19. – P. 2954-2959.

22 Sensenig R., Kalghatgi S., Cerchar E., Fridman G., Shereshevsky A., Torabi B., et al. Non-thermal plasma induces apoptosis in melanoma cells via production of intracellular reactive oxygen species // Ann Biomed Eng. – 2011. – Vol. 39, №2. – P. 674-687.

23 Tuhvatulin A.I., Sysolyatina E.V., Scheblyakov D.V., Logunov D.Y., Vasiliev M.M., Yurova M.A., et al. Non-thermal Plasma Causes p53-Dependent Apoptosis in Human Colon Carcinoma Cells // Acta naturae. – 2012. – Vol. 4, № 3. – P. 82-87.

24 Schmidt A., Dietrich S., Steuer A., Weltmann K.D., von Woedtke T., Masur K., et al. Non-thermal plasma activates human keratinocytes by stimulation of antioxidant and phase II pathways // The Journal of biological chemistry. – 2015. – Vol. 290, № 11. – P. 6731-6750.

25 Fridman A., Chirokov A., Gutsol A. Non-Thermal plasma atmospheric presure discharges // Journal of Physics D: Applied Physics. 2005; – Vol. 38, № 2. – P. R1-R24.

26 Жунусова А.С. Термалды емес плазманың сүтқоректілер клеткаларына әсері // Ізденіс журналы. Жаратылыстану және техника ғылымдары сериясы. – Алматы, 2013. – №2(1). – Б. 207-213.

27 Laroussi M., Mendis D.A., Rosenberg M. Plasma interaction with microbes // New Journal of Physics. – 2003. – Vol. 5, № 1. – P. 41.

28 Panngom K., Baik K.Y., Nam M.K., Han J.H., Rhim H., Choi E.H. Preferential killing of human lung cancer cell lines with mitochondrial dysfunction by nonthermal dielectric barrier discharge plasma // Cell death & disease. – 2013. – Vol. 4, № 5. – P. 1-8.

29 Fridman A. Plasma chemistry. – New york: Cambridge University Press, 2008. – 978 p.

30 Starkov A.A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2008. – Vol. 1147. – P. 37-52.

31 Nehra V., Kumar A., Dwivedi H.K. Atmospheric non-thermal plasma sources // International Journal of Engineering. – 2008. – Vol. 2, – №1. – P. 53-68.

32 Jogy I. Characteristics and classification of plasmas // PlasTEP trainings course and Sammer school. – 2011. – P. 1-33

33 Bunu M.S., Sasikala P., Dhanapal A., Kavitha V., Yazhini G., Rajamani L. Cold plasma as a novel food processing technology // International Jornal of Emerging trends in Engineering and Development. – 2012. – Vol. 4, – № 2. – P. 803-818.

34 Heinlin J., Morfill G., Landthaler M., Stolz W., Isbary G., Zimmermann J.L., Shimizu T., Karrer S. Plasma medicine: possible applications in dermatology // JDDG. – 2010. – Vol. 8, № 12. – P. 968–976.

35 Mott-Smith, H.M. History of "Plasmas" // Nature. – 1971. – Vol. 233, № 5316. – P. 219.

36 Vargo J.J. Clinical applications of the argon plasm a coagulator // Gastrointest Endosc. – 2004. – Vol. 59, № 1. – P. 81–88.

37 Алейник А.Н., Байков А.Н., Дамбаев Г.Ц., Денеко О.И., Жданова О.С., Красноженов Е.П., Семичев Е.В. Особенности взаимодействия неравновесной плазмы с живыми тканями // Вестник науки Сибири. – 2012. – № 3 (4). – С. 44-48.

38 Chirokov A., Gutsol A., Fridman A. Atmospheric pressure plasma of dielectric barrier discharges // Pure and Applied Chemistry. – 2006. – Vol. 77, № 2. – P. 487-495.

39 Eliasson B., Kogelschatz U. Nonequilibrium volume plasma chemical processing // IEEE Transactions on Plasma Science. – 1991. – Vol. 19, № 6. – P. 1063-1077.

40 Fridman G., Friedman G., Gutsol A., Shekhter A.B, Vasilets V.N., Fridman A. Applied plasma medicine // Plasma Process. Polym. – 2008. – Vol. 5, № 6. – P. 503-533.

41 Kim W., Woo K.C., Kim G.C., Kim K.T. Nonthermal-plasma-mediated animal cell death // J. Phys. D: Appl. Phys. – 2011. – Vol. 44. – P. 1-7.

42 Yasuda H., Myura T., Kurita H., Takashima K., Mizuno A. Biological Evaluation of DNA Damage in Bacteriophages Inactivated by Atmospheric Pressure Cold Plasma // Plasma Processes and Polymers. – 2010. – Vol. 7, № 3-4. – P. 301-308.

43 Georgescu N., Lungu C.P., Lupu A.R. Chemical activation of the high voltage pulsed, cold atmospheric plasma jets // Romanian Reports in Physics. – 2010. – Vol. 62, № 1. – P. 142-151.

44 Georgescu N., Lupu A.R. Tumoral and normal cells treatment with high voltage pulsed, cold atmospheric plasma jets // IEEE Trans. Plasma Sci. – 2010. – Vol. 38, № 8. – P. 1949-1955.

45 Lupu A.R., Georgescu N. Cold atmospheric plasma jet effects on V79-4 cells // Roum Arch Microbiol Immunol. – 2010. – Vol. 69, № 2. – P. 67-74.

46 Laroussi M., Tendero C., Lu X., Alla S., Hynes W.L. Inactivation of Bacteria by the Plasma Pencil // Plasma Process. Polym. – 2006. – Vol. 3, № 6-7. – P. 470-473.

47 Hermann H.W., Henins I., Park J., Selwyn G.S. Decontamination of chemical and biological warfare (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (AAPJ) // Physics of Plasmas. – 1998. – Vol. 6, № 5. – P. 2284-2289.

48 Sohbatzadeh F., Colagar A.H., Mirzanejhad S., Mahmodi S., E. coli, P. aeruginosa, and B. cereus bacteria sterilization using afterglow of non-thermal plasma at atmospheric pressure // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2010. – Vol. 160, № 7. – P. 1978-1984.

49 Lu X.P., Ye T., Cao Y.G., Sun Z.Y., Xiong Q., Tang Z.Y., et al. The roles of the various plasma agents in the inactivation of bacteria // J Appl Phys. – 2008. – Vol. 104, № 5. – P. 053309-053314.

50 Kong M.G., Kroesen G., Morfill G., Nosenko T., Shimizu T., Dijk J., Zimmermann J. L. Plasma medicine: an introductory review // New Journal of Physics. – 2009. – Vol. 11. – P. 1-35.

51 Dobrynin D., Fridman G., Friedman G., Fridman A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue // New Journal of Physics. – 2009. – Vol. 11, № 11. – P. 1-26.

52 NASA Glenn Research Center. http://www.nasa.gov/centers/glenn/moonandmars/med_topic_atomic_oxygen.html

53 Srivastava R. Apoptosis, cell signalling and human diseases. – Humana: Humana Press. 2007. – 368 p.

54 Bruce A., et al., Molecular Biology of the Cell. 6th ed. – New York: Garland Publishing, 2017. – 1616 p.

55 Surh Y.J., Kundu J.K., Na H.K., Lee J.S. Redox-Sensitive Transcription Factors as Prime Targets for Chemoprevention with Anti-Inflammatory and Antioxidative Phytochemicals // J. Nutr. – 2005. – Vol. 135. – P. 2993S-3001S.

56 Bienert G.P., Schjoerring J.K., Jahn T.P., Membrane transport of hydrogen peroxide // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2006. – Vol. 1758, № 8. – P. 994-1003.

57 Fink S.L., Cookson B.T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells // Infection and Immunity. – 2005. – Vol. 73, № 4. – P. 1907-1916.

58 Nanavaty U.B., Pawliczak R., Doniger J., Galdwin M.T., Cowan M.J., Logun C., Shelhamer J.H. Oxidant induced cell death in respiratory epithelial cells is due to

DNA damage and loss of ATP // Experimental Lung Research. – 2002. – Vol. 28, № 8. – P. 591-607.

59 Stoffels E. Tissue processing with atmospheric plasmas // Contrib Plasma Phys. – 2007. – Vol. 47, № 1-2. – P. 40–48.

60 Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medecine. 5th ed. – New York: Oxford University Press, 2015. – 905 p.

61 Martines E., Zuin M., Cavazzana R., Gazza E., Serianni G., Spagnolo S., et al. A novel plasma source for sterilization of living tissues // New J Phys. – 2009. – Vol. 11, № 11. – P. 115014-115022.

62 Laroussi M., Leipold F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure // Int J Mass Spectrom. – 2004. – Vol. 233, № 1-3. – P. 81-86.

63 Montie T.C., Kelly-Wintenberg K., Roth J.R. An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials // IEEE Trans Plasma Sci. – 2000. – Vol. 28, № 1. – P. 41-50.

64 Cooper M., Fridman G., Staack D., Gutsol A.F., Vasilets V.N., Anandan S., et al. Decontamination of surfaces from extremophile organisms using nonthermal atmospheric-pressure plasmas // IEEE Trans Plasma Sci. – 2009. – Vol. 37, № 6. – P. 866-871.

65 Yonson S., Coulombe S., Leveille V., Leask R.L. Cell treatment and surface functionalization using a miniature atmospheric pressure glow discharge plasma torch // J Phys D: Appl Phys. – 2006. – Vol. 39, № 16. – P. 3508-3513.

66 Laroussi M. Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art // Plasma Processes Polym. – 2005. – Vol. 2, № 5. – P. 391-400.

67 Prozialeck W.C., Edwards J.R. Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury // Pharmacol Ther. – 2007. – Vol. 114, № 1. – P. 74-93.

68 Laroussi M., Minayeva O., Dobbs F.C., Woods J. Spores survivability after exposure to low-temperature plasmas // IEEE Trans Plasma Sci. – 2006. – Vol. 34, № 4. – P. 1253-1256.

69 Yu H., Perni S., Shi J.J., Wang D.Z., Kong M.G., Shama G. Effects of cell surface loading and phase of growth in cold atmospheric gas plasma inactivation of Escherichia coli K12 // J Appl Microbiol. – 2006. – Vol. 101, № 6. – P. 1323-1330.

70 Goree J., Liu B., Drake D. Gas flow dependence for plasma-needle disinfection of S-mutans bacteria // J Phys D: Appl Phys. – 2006. – Vol. 39, № 16. – P. 3479-3486.

71 Jiang C., Chen M.T., Gorur A., Schaudinn C., Jaramillo D.E. Costerton JW, et al. Nanosecond pulsed plasma dental probe // Plasma Processes Polym. – 2009. – Vol. 6, № 8. – P. 479-483.

72 Deng X., Shi J., Kong M.G. Physical mechanisms of inactivation of bacillus subtilis spores using cold atmospheric plasmas // IEEE Trans Plasma Sci. – 2006. – Vol. 34, № 4. – P. 1310-1316.

73 Li G., Li H.P., Wang L.Y., Wang S., Zhao H.X., Sun W.T., et al. Genetic effects of radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharges with helium // Appl Phys Lett. – 2008. – Vol. 92, № 22. – P. 221504-221506.

74 Nosenko T., Shimizu T., Morfill G.E. Designing plasmas for chronic wound disinfection // New J Phys. – 2009. – Vol. 11, № 11. – P. 115013-115022.

75 Lee K., Paek2 Kh., Ju W.T., Lee Y. Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen // J Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 3. – P. 269–275.

76 Kawano H., Takamatsu T., Matsumura Y., Miyahara H., et al. Influence of Gas Temperature in Atmospheric Non-Equilibrium Plasma on Bactericidal Effect // Biocontrol Sci. – 2018. – Vol. 23, № 4. – P. 167-175.

77 Jiang C., Chen M.T., Schaudinn C., Gorur A., Vernier P.T., Costerton J.W., et al. Pulsed atmospheric-pressure cold plasma for endodontic disinfection // IEEE Trans Plasma Sci. – 2009. – Vol. 37, № 7. – P. 1190–1195.

78 Ikawa S., Kitano K., Hamaguchi S. Effects of pH on bacterial inactivation in aqueous solutions due to low-temperature atmospheric pressure plasma application // Plasma Processes Polym. – 2010. – Vol. 7, № 1. – P. 33-42.

79 Stoffels E., Roks A.J.M., Deelman, L.E. Delayed effects of cold atmospheric plasma on vascular cells // Plasma Processes Polym. – 2008. – Vol. 5, № 6. – P. 599–605.

80 Kamgang J.O., Briandet R., Herry J.M., Brisset J.L., Naitali M. Destruction of planktonic, adherent and biofilm cells of Staphylococcus epidermidis using a gliding discharge in humid air // J Appl Microbiol. – 2007. – Vol. 103, № 3. – P. 621-628.

81 Hahnel M., von Woedtke T., Weltmann K.D. Influence of the air humidity on the reduction of bacillus spores in a defined environment at atmospheric pressure using a dielectric barrier surface discharge // Plasma Processes and Polymers. – 2010. – Vol. 7, № 3-4. – P. 244-249.

82 Bhatt S., Mehta P., Chen C., Schneider C.L., White L.N., Chen H.L., Kong M.G. Efficacy of low-temperature plasma-activated gas disinfection against biofilm on contaminated GI endoscope channels // Gastrointest Endosc. – 2019. – Vol. 89, № 1. – P. 105-114.

83 Puligundla P., Mok C. Inactivation of spores by nonthermal plasmas // World J Microbiol Biotechnol. – 2018. – Vol. 34, № 143.

84 Hirst A.M., Frame F.M., Arya M., Maitland N.J., O'Connell D. Low temperature plasmas as emerging cancer therapeutics: the state of play and thoughts for the future // Tumour Biol. – 2016. – Vol. 37, № 6. – P. 7021-7031.

85 Stoffels E., Gonzalvo Y.A., Whitmore T.D., Seymour D.L., Rees J.A. A plasma needle generates nitric oxide // Plasma Sources Sci Technol. – 2006. – Vol. 15, № 3. – P. 501–506.

86 Kim S.J., Chung T.H., Bae S.H., Leem S.H. Bacterial inactivation using atmospheric pressure single pin electrode microplasma jet with a ground ring // Appl Phys Lett. – 2009. – Vol. 94, № 14. – P. 141502-141504.

87 Perni S., Shama G., Hobman J.L., Lund P.A., Kershaw C.J., Hidalgo-Arroyo G.A., et al. Probing bactericidal mechanisms induced by cold atmospheric plasmas with Escherichia coli mutants // Appl Phys Lett. – 2007. – Vol. 90, № 7. – P. 073902-073903.

88 Muranyi P., Wunderlich J., Heise M. Influence of relative gas humidity on the inactivation efficiency of a low temperature gas plasma // J Appl Microbiol. – 2008. – Vol. 104, № 6. – P. 1659-1666.

89 Maeda Y., Igura N., Shimoda M., Hayakawa I. Inactivation of Escherichia coli K12 using atmospheric gas plasma produced from humidified working gas // Acta Biotechnol. – 2003. – Vol. 23, № 4. – P. 389-395.

90 Raballand V., Benedikt J., Wunderlich J., von Keudell A. Inactivation of Bacillus atrophaeus and of Aspergillus niger using beams of argon ions, of oxygen molecules and of oxygen atoms // J Phys D: Appl Phys. – 2008. – Vol. 41, № 11. – P. 115207-115215.

91 Stoffels E., Sakiyama Y., Graves D. B. Cold atmospheric plasma: charged species and their interactions with cells and tissues // IEEE Trans. Plasma Sci. – 2008. – Vol. 36, № 4. – P. 1441–1457.

92 Kalghatgi S.U., Fridman G., Fridman A., Friedman G., Clyne A.M. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma treatment of endothelial cells // Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. – 2008. – Vol. 2008. – P. 3578-3581.

93 Kieft I.E., Darios D., Roks A.J.M. Stoffels E. Plasma treatment of mammalian vascular cells: a quantitative description // IEEE Trans. Plasma Sci. – 2005. – Vol. 33, № 2. – P. 771-775.

94 Kieft I.E., Kurdi M., Stoffels E. Reattachment and apoptosis after plasma-needle treatment of cultures cells // IEEE Trans. Plasma Sci. – 2006. – Vol. 34, № 4. – P. 1331-1336.

95 Shashurin A., Keidar M., Bronnikov S., Jurjus R. A., Stepp M.A. Living tissue under treatment of cold plasma atmospheric jet // Appl. Phys. Lett. – 2008. – Vol. 93, № 18. – P. 1-3.

96 Stoffels E., Kieft I.E., Sladek R.E. Superficial treatment of mammalian cells using plasma needle // J. Phys. D: Appl. Phys. – 2003. – Vol. 36. – P. 2908-2913.

97 Shi X.M., Xu G.M., Zhang G.J., Liu J.R., et al. Low-temperature Plasma Promotes Fibroblast Proliferation in Wound Healing by ROS-activated NF-κB Signaling Pathway // Curr Med Sci. – 2018. – Vol. 38, № 1. – P. 107-114.

98 Kumar N., Attri P., Yadav D.K., Choi J., Choi E.H., Uhm H.S. Induced apoptosis in melanocytes cancer cell and oxidation in biomolecules through deuterium oxide generated from atmospheric pressure non-thermal plasma jet // Sci Rep. – 2014. – Vol. 4, № 7589.

99 Kaushik N.K., Ghimire B., Li Y., Adhikari M., Veerana M., Kaushik N., Jha N., Adhikari B., Lee S.J., Masur K., von Woedtke T., Weltmann K.D., Choi E.H. Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions // Biol Chem. – 2018. – Vol. 400, № 1. – P. 39-62.

100 Shi L., Wang Y., Ito F., Okazaki Y., Tanaka H., Mizuno M., Hori M., Richardson D.R., Toyokuni S. Biphasic effects of l-ascorbate on the tumoricidal activity of non-thermal plasma against malignant mesothelioma cells // Arch Biochem Biophys. – 2016. – Vol. 605. – P. 109-116.

101 Thiyagarajan M., Sarani A., Gonzales X.F. Characterization of an atmospheric pressure plasma jet and its applications for disinfection and cancer treatment // Stud Health Technol Inform. – 2013. – Vol. 184. – P. 443-449.

102 Haertel B., Hähnel M., Blackert S., Wende K., von Woedtke T., Lindequist U. Surface molecules on HaCaT keratinocytes after interaction with non-thermal atmospheric pressure plasma // Cell Biol Int. – 2012. – Vol. 36, № 12. – P. 1217-1222.

103 Zucker S.N., Zirnheld J., Bagati A., DiSanto T.M., Des Soye B., Wawrzyniak J.A., Etemadi K., Nikiforov M., Berezney R. Preferential induction of apoptotic cell death in melanoma cells as compared with normal keratinocytes using a non-thermal plasma torch // Cancer Biol Ther. – 2012. – Vol. 13, № 13. – P. 1299-306.

104 Vandamme M., Robert E., Lerondel S., Sarron V., Ries D., Dozias S., et al. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma // International journal of cancer Journal international du cancer. – 2012. – Vol. 130, № 9. – P. 2185–2194.

105 Stoffels E. Plasma needle: Treatment of living cells and tissues // Proc. Gaseous Electron. Conf., San Francisco, C A. – 2003. – P. 16.

106 Fridman G., Shereshevsky A., Jost M., Brooks A., Fridman A., Gutsol A., Vasilets V., Friedman G. Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines // Plasma Chem Plasma Process. – 2007. – Vol. 27, № 2. – P. 163-176.

107 Lee H.J, Shon C.H, Kim Y.S, Kim S, Kim G.C, Kong M.G. Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma // New Journal of Physics. – 2009. – Vol. 11, № 11. – P. 1-13.

108 Hall E. H., Schoenbach K. H., Beebe S. J. Non-ionizing Radiation Generated by Nanosecond Pulsed Electric Fields Induce Apoptosis in HCT116 Colon Carcinoma Cells // Apoptosis. – 2007. – Vol. 12. – P. 1721-1731.

109 Asgari Y., Zabihinpour Z., Salehzadeh-Yazdi A., Schreiber F., Masoudi-Nejad A. Alterations in cancer cell metabolism: the Warburg effect and metabolic adaptation // Genomics. – 2015. – Vol. 105, № 5-6. – P. 275-281.

110 Мырзағалиева А.Б. Цитология: Оқулық. – Алматы: Дәуір, 2013. – 216 б.

111 Wallace D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine // Annu. Rev. Genet. – 2005. – Vol. 39. – P. 359-407.

112 Жунусова А.С., Орынбаева З.С., Төлеуханов С.Т. Митохондриялық биоэнергетика // Қазақстан Республикасы Ұлттық ғылым академиясының хабарлары. Биология және медицина сериясы. – Алматы, 2017. – № 3(321). – Б. 120-140.

113 Сапаров Қ.Ә. Цитология және гистология. Оқу құралы. – Алматы: Қазақ университеті, 2009. – 128 б.

114 Szewczyk A., Wojtczak L. Mitochondria as a Pharmacological Target // Pharmacol Rev. – 2002. – 54: 101-127.

115 Корженевская М.А., Анисимова Л.Е., Болонина В.П., Розенфелъд С.В., Степанов Н.Н., Того Е.Ф. Молекулярная биология и патология клетки: курс лекций для студентов медицинских вузов. В 4-х ч. - Часть. 1. - СПб.: Издательство СПбГМУ, 2011. – 55 с.

116 Огурцов А.Н. Биохимия для студентов. Часть 5. Биоэнергетика и фотосинтез. - 2015. - 40 с.

117 Bhaskar S. Mandavilli, Janine H., et al. Mitochondrial DNA repair and aging // Mutat. Res. - 2002. - Vol. 509, № 1-2. - P. 127-151.

118 Lehninger A. L., Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger principles of biochemistry. – New York: Worth Publishers, 2000. – 1340 p.

119 Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: В 3-х т. 2-е изд., перераб. М75 и доп. Т.1. Пер. с англ. – М.: Мир, 1994. - 517 с.

120 Заводник И.Б. Биоэнергетика. Преобразования энергии в биологических системах // Біялогія: праблемы выкладання. – 2012 . – № 4. – С. 3-11.

121 Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. Митохондриальный Комплекс I // Успехи биологической химии. – 2003. – № 43, – С. 19-58.

122 Скулачев В.П.. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии. - М.: Высш. шк., 1989. – 271 с.

123 Тихонов А.Н. Молекулярные преобразователи энергии в живой клетке // Соросовский образовательный журнал. – 1997, – №7. – С. 10-17.

124 Тихонов А.Н. Молекулярные моторы. Часть 1. Вращающиеся моторы живой клетки // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 6. – С. 8-16.

125 Ленинджер А. Основы биохимии. – В 3-х томах. – Т. 2 / Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 368 с.

126 Мазунин И.О., Володько Н.В., Стариковская Е.Б., Сукерник Р.И. Митохондриальный геном и митохондриальные заболевания человека // Молекулярная биология. – 2010. – № 44(5). – С. 755–772.

127 Давыдов В.В., Клещев Н.Ф.. Основы общей биохимии: Учеб. пособие. – Харьков: НТУ ХПИ, 2007. – 380 с.

128 Zickermann V., Dröse S., Tocilescu M.A., Zwicker K., Kerscher S., Brandt U. Challenges in elucidating structure and mechanism of proton pumping NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) // J. Bioenerg. Biomembr. – 2008. – Vol. 40, № 5. – P. 475–483.

129 Hunte C., Palsdottir H., Trumpower B.L. Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex // FEBS Lett. – 2003. – Vol. 545, № 1. – P. 39-46.

130 Belevich I., Verkhovsky M.I. Molecular mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase // Antioxid. Redox Signal. – 2008. – Vol. 10, № 1. – P. 1-29.

131 von Ballmoos C., Wiedenmann A., Dimroth P. Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases // Annu. Rev. Biochem. – 2009. – Vol. 78. – P. 649–672.

132 Garrett R.H., Grisham C.M. Biochemistry. 5th ed. Brooks/Cole. Belmont: Cengage Learning, 2013. – 1288 p.

133 Voet D., Voet J.G., Pratt C.W. Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level, 4th edition. Wiley, 2013. – 1204 p.

134 Pelley J.W. Elsevier's integrated review biochemistry, 2nd edition. Philadelphia, PA, 2012. - 253 p.

135 Ragan, C. I., and Bloxham, D. P. Specific labelling of a constituent polypeptide of bovine heart mitochondrial reduced nicotinamide-adenine dinucleotide-ubiquinone reductase by the inhibitor diphenyleneiodonium // Biochem. J. – 1977. – Vol. 163, № 3. – P. 605–615.

136 Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабельных О.И. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез / Отв. ред. Р.К. Саляев. – Москва, 2004. – 98 с.

137 Majander, A., Finel, M., Wikstrom, M. Diphenyleneiodonium inhibits reduction of iron-sulfur clusters in the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) // J. Biol. Chem. – 1994. – Vol. 269, № 33. – P. 21037–21042.

138 Li Y., Trush M.A. Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production // Biochem Biophys. Res. Commun. – 1998. – Vol. 253, № 2. – P. 295-299.

139 Huang L.S, Sun G., Cobessi D., Wang A.C., Shen J.T., Tung E.Y., Anderson V.E., Berry E.A. 3-nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme // J Biol Chem. – 2006. – Vol. 281, № 9. – P. 5965-5972.

140 Roberts T. J. 3-Nitropropionic Acid Model of Metabolic Stress // Stroke Genomics:Methods and Review. Methods in Molecular Medicine. – 2004. – Vol. 104. – P. 203-220.

141 Mowery P.C., Steenkamp D.J., Ackrell A.C., Singer T.P., White G.A. Inhibition of mammalian succinate dehydrogenase by carboxins // Arch Biochem Biophys. – 1977. – Vol. 178, № 2. – P. 495-506.

142 Mowery P.C., Ackrell B.A., Singer T.P. Carboxins: powerful selective inhibitors of succinate oxidation in animal tissues // Biochem Biophys Res Commun. – 1976. – Vol. 71, № 1. – P. 354-361.

143 Pardee A.B., Potter V.R. Malonate Inhibition of Oxidations in the Krebs Tricarboxylic Acid Cycle // Journal of Biological Chemistry. – 1948. – Vol. 178, № 1. – P. 241-250.

144 Ma X., Jin M., Cai Y., Xia H., Long K., Liu J., Yu Q., Yuan J. Mitochondrial electron transport chain complex III is required for antimycin A to inhibit autophagy // Chem Biol. – 2011. – Vol. 18, № 11. – P. 1474-1481.

145 Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. Biochemistry, 5th edition. – New York: W.H. Freeman and Company, 2002. – 1515 p.

146 Nakayama K., Okamoto F., Harada Y. Antimycin A: isolation from a new Streptomyces and activity against rice plant blast fungi // J Antibiot (Tokyo). – 1956. – Vol. 9, № 2. – P. 63-66.

147 Campo M.L, Kinnally K.W, Tedeschi H. The effect of antimycin A on mouse liver inner mitochondrial membrane channel activity // J Biol Chem. – 1992. – Vol. 267, № 12. – P. 8123-8127.

148 Maguire J.J, Kagan V.E, Packer L. Electron transport between cytochrome c and alpha tocopherol // Biochem Biophys Res Commun. – 1992. – Vol. 188, № 1. – P. 190-197.

149 Pham N.A, Robinson B.H, Hedley D.W. Simultaneous detection of mitochondrial respiratory chain activity and reactive oxygen in digitonin-permeabilized cells using flow cytometry // Cytometry. – 2000. – Vol. 41, № 4. – P. 245-251.

150 Balaban R.S., Nemoto S., Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging // Cell. – 2005. – Vol. 120, № 4. – P. 483–495.

151 Panduri V., Weitzman S.A., Chandel N.S., Kamp D.W. Mitochondrial-derived free radicals mediate asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. – 2004. – Vol. 286, № 6. – P. L1220-1227.

152 Hiram F. Gilbert. Basic concepts in biochemistry. A students survival guide, Second edition. McGraw-Hill Companies, 2000. – 331 p.

153 Campbell M., Farrell S. Biochemistry, 7th ed. Brooks/Cole, 2012. - 861 p.

154 Wang F., Luo D.Q., Liu J.K. Aurovertin E, a new polyene pyrone from the basidiomycete Albatrellus confluens // J Antibiot (Tokyo). – 2005. – Vol. 58, № 6. – P. 412-415.

155 Susa J.B., Lardy H.A. Antibiotics as Tools for Metabolic Studies XVIII. Inhibition of Sodium- and Potassium-Dependent Adenosine Triphosphatase // Molecular Pharmacology. – 1975. – Vol. 11, № 2. – P. 166-173.

156 Toei M., Noji H. Single-molecule analysis of $F_oF_1$-ATP synthase inhibited by N,N-dicyclohexylcarbodiimide // J Biol Chem. – 2013. – Vol. 288, № 36. – P. 25717-25726.

157 Jastroch M., Divakaruni A.S., Mookerjee S., Treberg J.R., Brand M.D. Mitochondrial proton and electron leaks // Essays in biochemistry. – 2010. – Vol. 47. – P. 53–67.

158 Самарцев В.Н. Жирные кислоты как разобщители окислительного фосфорилирования // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 9. – С.1173-1189.

159 McCord J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress // Am. J. Med. Genet. – 2000. – Vol. 108, № 8. – P. 652-659.

160 Evans A.R., Limp-Foster M., Kelley M.R. Going APE over ref-1 // Mutat. Res. – 2000. – Vol. 461, № 2. – P. 83-108.

161 Kelley M.R., Pasons S.H. Redox regulation of the DNA repair function of the human AP endonuclease Ape1/ref-1 // Antioxid. Redox Signal. – 2001. – Vol. 3, № 4. – P. 671-683.

162 Jones D.P. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress // Chem. Biol. Interact. – 2006. – Vol. 163, № 1-2. – P. 38-53.

163 Hansen J.M., Go Y.M., Jones D.P. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2006. – Vol. 46, № 1-2. – P. 215-234.

164 Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiological Reviews. – 2002. – Vol. 82, № 1. – P. 47–95.

165 Brand M.D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production // Experimental Gerontology. – 2010. – Vol. 45. – P. 466-472.

166 Quinlan C.L, Goncalves., R.L., Hey-Mogensen M., Yadava N., et al. The 2-oxoacid dehydrogenase complexes in mitochondria can produce superoxide/hydrogen peroxide at much higher rates than complex I // The Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Vol. 289, № 12. – P. 8312-8325.

167 Cassarino D.S., Fall C.P, Swerdlow R.H, Smith T.S., Halvorsen E.M., et al. Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease // Biochim. Biophys. Acta. – 1997. – Vol. 1362, № 1. – P. 77-86.

168 Cassarino D.S., Swerdlow R.H, Parks J.K., Parker W.D.Jr., Bennett J.P.Jr. Cyclosporin A increases resting mitochondrial membrane potential of Alzheimer's disease cybrids // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1998. – Vol. 248, № 1. – P. 168-173.

169 Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C, Reed R.R., Snyder S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase // Nature. – 1991. – Vol. 351, № 6329. – P. 714-718.

170 Lowenstein C.J., Glatt C.S., Bredt D.S., Snyder S.H. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrats with the brain enzyme // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 6711-6715.

171 Marsden P.A., Schappert K.T., Chen H.S., Flowers M., Sundell C.L., et al. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase // FEBS Lett. – 1992. – Vol. 307, № 3. – P. 287-293.

172 Rajfer J., Aronson W.J., Bush P.A., Dorey F.J., Ignarro L.J. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission // N. Engl. J. Med. – 1992. – Vol. 326, № 2. – P. 90-94.

173 Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease // Physiol. Rev. – 2007. – Vol. 87, № 1. – P. 315-424.

174 Dakubo G.D., Parr R.L., Costello L.C., Franklin R.B., Thayer R.E. Altered metabolism and mitochondrial genome in prostate cancer // J Clin Pathol. – 2006. – Vol. 59, № 1. – P. 10-16.

175 Costello L.C., Franklin R.B. The intermediary metabolism of the prostate: a key to understanding the pathogenesis and progression of prostate malignancy. Oncology. – 2000. – Vol. 59, № 4. – P. 269-282.

176 Costello L.C., Feng P., Milon B., Tan M., Franklin R.B. Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer: critical issues to resolve // Prostate Cancer Prostatic Dis. – 2004. – Vol. 7, № 2. – P. 111-117.

177 Аляев Ю.Г., Безруков Е.Е., Винаров А.З. Рак предстательной железы // Врач. – 2003. – № 10. – С. 24-29.

178 Жумагазин Ж.Д., Алчинбаев М.К., Арзынкулов Ж.А., Есенбаев Е.Ж. Рак предстательной железы. – Алматы, 2002. - 106 с.

179 Costello L.C., Franklin RB, Feng P. Mitochondrial function, zinc, and intermediary metabolism relationships in normal prostate and prostate cancer // Mitochondrion. – 2005. – Vol. 5, № 3. – P. 143-153.

180 Costello LC, Franklin R.B., Zou J., Feng P., Bok R., Swanson M.G., et al. Human prostate cancer ZIP1/zinc/citrate genetic/metabolic relationship in the TRAMP prostate cancer animal model // Cancer Biol Ther. – 2011. – Vol. 12, № 12. – P. 1078-1084.

181 Eidelman E., Twum-Ampofo J., Ansari, J., Siddiqui M.M. The Metabolic Phenotype of Prostate Cancer // Frontiers in oncology. – 2017. – Vol. 7, № 131. – P. 1-6.

182 Sing K.K. Mitochondria damage checkpoint in apoptosis and genome stability // FEMS Yeast Res. – 2004. – Vol. 5, № 2. – P. 127-132.

183 Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: The next generation // Cell. - 2011. - Vol. 144. - P. 646-674.

184 Pavlova N.N., Thompson C.B. The emerging hallmarks of cancer metabolism // Cell Metab. – 2016. – Vol. 23. – P. 27-47.

185 Cutruzzola F., Giardina G., Marani M., Macone A., Paiardini A., Rinaldo S., Paone A. Glucose metabolism in the progression of prostate cancer // Front Physiol. – 2017. – Vol. 8, № 97.

186 Hevia D., Gonzalez-Menendez P., Fernandez-Fernandez M., Cueto S., et al. Melatonin Decreases Glucose Metabolism in Prostate Cancer Cells: A 13C Stable Isotope-Resolved Metabolomic Study // Int J Mol Sci. – 2017. – Vol. 18, № 8.

187 Franz M.C., Anderle P., Bürzle M., Suzuki Y., Freeman M.R., Hediger M.A., et al. Zinc transporters in prostate cancer // Mol Aspects Med. – 2013. – Vol. 34. – P. 735-741.

188 Feng P., Li T.L., Guan Z.X., Franklin R.B., Costello L.C. Direct effect of zinc on mitochondrial apoptogenesis in prostate cells // Prostate. – 2002. – Vol. 52, № 4. – P. 311-318.

189 Giunchi F, Fiorentino M, Loda M. The metabolic landscape of prostate cancer // Eur Urol Oncol. – 2018.

190 Metallo C.M., Gameiro P.A., Bell E.L., Mattaini K.R., Yang J., Hiller K., et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia // Nature. – 2011. – Vol. 481, № 7381. – P. 380-384.

191 Pan T., Gao L., Wu G., Shen G., Xie S., Wen H., et al. Elevated expression of glutaminase confers glucose utilization via glutaminolysis in prostate cancer // Biochem Biophys Res Commun. – 2015. – Vol. 456, № 1. – P. 452-458.

192 Moncada S., Higgs E.A., Colombo S.L. Fulfilling the metabolic requirements for cell proliferation // Biochem J. – 2012. – Vol. 446, № 1. – P. 1-7.

193 Wang Q., Hardie R.A., Hoy A.J., van Geldermalsen M., Gao D., Fazli L., et al. Targeting ASCT2-mediated glutamine uptake blocks prostate cancer growth and tumour development // J Pathol. – 2015. – Vol. 236, № 3. – P. 278-289.

194 Wise D.R., Thompson C.B. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer // Trends Biochem Sci. – 2010. – Vol. 35, № 8. – P. 427-433.

195 Yue S., Li J., Lee S.Y. et al. Cholesterylester accumulation Induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies humanprostate cancer aggressiveness // Cell Metab. – 2014. – Vol. 19, № 3. – P. 393-406.

196 Wang Q., Bailey C.G., Ng C. et al. Androgen receptor and nutrient signaling pathways coordinate the demand for increased amino acid transport during prostate cancer progression // Cancer Res. – 2011. – Vol. 71, № 24. – P. 7525-7536.

197 Singh G., Lakkis C.L., Laucirica R., Epner D.E. Regulation of prostate cancer cell division by glucose // J Cell Physiol. – 1999. – Vol. 180, № 3. – P. 431-438.

198 Murtola T.J., Wahlfors T., Haring A., Taari K., et al. Polymorphisms of genes involved in glucose and energy metabolic pathways and prostate cancer: interplay with metformin // Eur Urol. – 2015. – Vol. 68, №3. – P. 1089-1097.

199 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.

200 Jadvar H. Prostate cancer // Methods Mol Biol. – 2011. – Vol. 727. – P. 265-290.

201 Gonzalez-Menendez P., Hevia D., Alonso-Arias R., et al. GLUT1 protects prostate cancer cells from glucose deprivation-induced oxidative stress // Redox Biol. – 2018. – Vol. 17. – P. 112-127.

202 Ngo D.C., Ververis K., Tortorella S.M., Karagiannis T.C. Introduction to the molecular basis of cancer metabolism and the Warburg effect // Mol Biol Rep. – 2015. – Vol. 42, № 4. – P. 819-823.

203 Sadeghi R.N., Karami-Tehrani F., Salami S. Targeting prostate cancer cell metabolism: impact of hexokinase and CPT-1 enzymes // Tumour Biol. – 2015. – Vol. 36, № 4. – P. 2893-2905.

204 Twum-Ampofo J., Fu D.X., Passaniti A., Hussain A., Siddiqui M.M. Metabolic targets for potential prostate cancer therapeutics // Curr Opin Oncol. – 2016. – Vol. 28, № 3. – P. 241-247.

205 Dueregger A., Schöpf B., Eder T., Höfer J., Gnaiger E., Aufinger A., et al. Differential utilization of dietary fatty acids in benign and malignant cells of the prostate // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 8.

206 Schöder H., Larson S. M. Positron emission tomography for prostate, bladder, and renal cancer // Semin. Nucl. Med. – 2004. – Vol. 34, № 4. – P. 274-292.

207 Testa C., Pultrone C., Manners D. N., Schiavina R., Lodi R. Metabolic imaging in prostate cancer: where we are // Front. Oncol. – 2016. – Vol. 6, № 225.

208 Swartz M.A., Iida N., Roberts E.W., Sangaletti S., Wong M.H., Yull F.E., Coussens L.M., DeClerck Y.A. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy // Cancer Res. – 2012. – Vol. 72, № 10. – P. 2473-2480.

209 Martinez-Outschoorn U.E., Pestell R.G., Howell A., Tykocinski M.L., Nagajyothi F., Machado F.S., Tanowitz H.B., Sotgia F. Lisanti M.P. Energy transfer in “parasitic” cancer metabolism: mitochondria are the powerhouse and Achilles’ heel of tumor cells // Cell Cycle. – 2011. – Vol. 10, № 24. – P. 4208-4216.

210 Edlund M., Sung S.Y., Chung L.W. Modulation of prostate cancer growth in bone microenvironments // J Cell Biochem. – 2004. – Vol. 91, № 4. – P. 686-705.

211 Robey I.F., Baggett B.K., Kirkpatrick N.D., Roe D.J., Dosescu J., Sloane B.F., Hashim A.I., Morse D.L., Raghunand N., Gatenby R.A., Gillies R.J. Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases // Cancer Res. – 2009. – Vol. 69, № 6. – P. 2260-2268.

212 Kato Y., Ozawa S., Miyamoto C., Maehata Y., Suzuki A., Maeda T., Baba Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer // Cancer Cell Int. – 2013. – Vol. 13, № 1. – P. 89.

213 Smallbone K., Gavaghan D.J., Gatenby R.A., Maini P.K. The role of acidity in solid tumour growth and invasion // J Theor Biol. – 2005. – Vol. 235, № 4. – P. 476-484.

214 Meyer K.A., Kammerling E.M., et al. pH studies of malignant tissues in human beings // Cancer Res. – 1948. – Vol. 8, № 11. – P. 513-518.

215 Schickling B.M., Aykin-Burns N., Leslie K.K., Spitz D.R., Korovkina V.P. An inhibitor of K+ channels modulates human endometrial tumor-initiating cells // Cancer Cell Int. – 2011. – Vol. 11, № 1. – P. 25.

216 Skryma R.N., Prevarskaya N.B., Dufy-Barbe L., Odessa M.F., Audin J., Dufy B. Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: involvement in cell proliferation // Prostate. – 1997. – Vol. 33, № 2. – P. 112-122.

217 Prevarskaya N., Skryma R., Bidaux G., Flourakis M., Shuba Y. Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells // Cell Death Differ. – 2007. – Vol. 14, № 7. – P. 1295-1304.

218 Sontheimer H. An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis // Exp Biol Med (Maywood). – 2008. – Vol. 233, № 7. – P. 779-791.

219 Peterlik M., Grant W.B., Cross H.S. Calcium, vitamin D and cancer // Anticancer Res. – 2009. – Vol. 29, № 9. – P. 3687-3698.

220 Abercrombie M., Ambrose E.J. The surface properties of cancer cells: a review // Cancer Res. – 1962. – Vol. 22. – P. 525-548.

221 Lamonte G., Tang X., Chen J.L., Wu J., Ding C.K., Keenan M.M., Sangokoya C., Kung H.N., Ilkayeva O., Boros L.G., Newgard C.B., Chi J.T. Acidosis induces reprogramming of cellular metabolism to mitigate oxidative stress // Cancer Metab. – 2013. – Vol. 1, № 1. – P. 23.

222 Riemann A., Schneider B., Ihling A., Nowak M., Sauvant C., Thews O., Gekle M. Acidic environment leads to ROS-induced MAPK signaling in cancer cells // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, № 7.

223 Vaupel P.W., Frinak S., Bicher H.I. Heterogeneous oxygen partial pressure and pH distribution in C3H mouse mammary adenocarcinoma // Cancer Res. – 1981. – Vol. 41, № 5. – P. 2008-2013.

224 Gillies R.J., Liu Z., Bhujwalla Z. 31P-MRS measurements of extracellular pH of tumors using 3-aminopropylphosphonate // Am J Physiol. – 1994. – Vol. 267. – P. C195-203.

225 Barar J. Omidi Y. Dysregulated pH in tumor microenvironment checkmates cancer therapy // Bioimpacts. – 2013. – Vol. 3, № 4. – P. 149-162.

226 Martinez-Outschoorn U.E., Sotgia F., Lisanti M.P. Power surge: supporting cells “fuel” cancer cell mitochondria // Cell Metab. – 2012. – Vol. 15, № 1. – P. 4-5.

227 Whitaker-Menezes D., Martinez-Outschoorn U.E., Flomenberg N., Birbe R.C., Witkiewicz A.K., Howell A., Pavlides S., Tsirigos A., Ertel A., Pestell R.G., Broda P., Minetti C., Lisanti M.P., Sotgia F. Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells in situ: visualizing the therapeutic effects of metformin in tumor tissue // Cell Cycle. – 2011. – Vol. 10, № 23. – P. 4047-4064.

228 Hems R., Stubbs M., Krebs H.A. Restricted permeability of rat liver for glutamate and succinate // Biochem J. – 1968. – Vol. 107, № 6. – P. 807-815.

229 Clerc P., Polster B.M. Investigation of mitochondrial dysfunction by sequential microplate-based respiration measurements from intact and permeabilized neurons // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 4. – P. e34465.

230 Prusiner S.B., Cannon B., Lindberg O. Oxidative metabolism in cells isolated from brown adipose tissue. 1. Catecholamine and fatty acid stimulation of respiration // Eur J Biochem. – 1968. – Vol. 6, № 1. – P. 15-22.

231 Williamson J.R. Control of energy metabolism in hamster brown adipose tissue. // J Biol Chem. – 1970. – Vol. 245, № 8. – P. 2043-2050.

232 Spencer T.L. The transport and oxidation of succinate by Ehrlich ascites-tumour cells // Biochem J. – 1976. – Vol. 160, № 1. – P. 121-123.

233 Wright E.M. Transport of carboxylic acids by renal membrane vesicles // Annu Rev Physiol. – 1985. – Vol. 47. – P. 127-141.

234 Guder W.G., G. Wirthensonh. Renal turnover of substrates. In Renal Transport of Organic Substances. Greger R., Lang F., Silbernagl S. editors. Berlin: Springer-Verlag. – 1981. – P. 66-77.

235 Sadagopan N., Li W., Roberds S.L., Major T., Preston G.M., Yu Y., Tones M.A. Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease // Am J Hypertens. – 2007. – Vol. 20, № 11. – P. 1209-1215.

236 Krebs H.A. Chemical composition of blood plasma and serum // Annu Rev Biochem. – 1950. – Vol. 19. – P. 409-430.

237 Hems D.A., Brosnan J.T. Effects of ischaemia on content of metabolites in rat liver and kidney in vivo // Biochem J. – 1970. – Vol. 120, № 1. – P. 105-111.

238 Hochachka P.W., Dressendorfer R.H. Succinate accumulation in man during exercise // Eur J Appl Physiol Occup Physiol. – 1976. – Vol. 35, № 4. – P. 235-242.

239 Chouchani E.T., Pell V.R., Gaude E., Aksentijevic D., Sundier S.Y., Robb E.L., Logan A., Nadtochiy S.M., Ord E.N., Smith A.C., Eyassu F., Shirley R., et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS // Nature. – 2014. – Vol. 515, № 7527. – P. 431-435.

240 Zhang T., Wu X., Ke C., Yin M., Li Z., Fan L., Zhang W., Zhang H., Zhao F., Zhou X., Lou G., Li K. Identification of potential biomarkers for ovarian cancer by urinary metabolomic profiling // J Proteome Res. – 2013. – Vol. 12, № 1. – P. 505-512.

241 Oswald S., Grube M., Siegmund W., Kroemer H.K. Transporter-mediated uptake into cellular compartments // Xenobiotica. – 2007. – Vol. 37, № 10-11. – P. 1171-1195.

242 Pajor A.M. Sodium-coupled transporters for Krebs cycle intermediates // Annu Rev Physiol. – 1999. – Vol. 61. – P. 663-682.

243 Wang H., Fei Y.J., Kekuda R., Yang-Feng T.L., Devoe L.D., Leibach F.H., Prasad P.D., Ganapathy V. Structure, function, and genomic organization of human Na(+)-dependent high-affinity dicarboxylate transporter // Am J Physiol Cell Physiol. – 2000. – Vol. 278, № 5. – P. C1019-1030.

244 Wright S.H., Hirayama B., Kaunitz J.D., Kippen I., Wright E.M. Kinetics of sodium succinate cotransport across renal brush-border membranes // J Biol Chem. – 1983. – Vol. 258, № 9. – P. 5456-5462.

245 Ogin C., Grassl S.M. Dicarboxylate transport in human placental brush-border membrane vesicles // Biochim Biophys Acta. – 1989. – Vol. 980, № 2. – P. 248-254.

246 Shank R.P., Bennett D.J. 2-Oxoglutarate transport: a potential mechanism for regulating glutamate and tricarboxylic acid cycle intermediates in neurons // Neurochem Res. – 1993. – Vol. 18, № 4. – P. 401-410.

247 Wolffram S., Badertscher M., Scharrer E. Carrier-mediated transport is involved in mucosal succinate uptake by rat large intestine // Exp Physiol. – 1994. – Vol. 79, № 2. – P. 215-226.

248 Huang W., Wang H., Kekuda R., Fei Y.J., Friedrich A., Wang J., Conway S.J., Cameron R.S., Leibach F.H., Ganapathy V. Transport of N-acetylas-partate by the Na(+)-dependent high-affinity dicarboxylate transporter NaDC3 and its relevance to the expression of the transporter in the brain // J Pharmacol Exp Ther. – 2000. – Vol. 295, № 1. – P. 392-403.

249 Mycielska M.E., Palmer C.P., Brackenbury W.J., Djamgoz M.B. Expression of Na+-dependent citrate transport in a strongly metastatic human prostate cancer PC-3M cell line: regulation by voltage-gated Na+ channel activity // J Physiol. – 2005. – Vol. 563. – P. 393-408.

250 Mycielska M.E., Djamgoz M.B. Citrate transport in the human prostate epithelial PNT2-C2 cell line: electrophysiological analyses // J Physiol. – 2004. – Vol. 559. – P. 821-833.

251 Максимова Д.А., Губанова Н.В., Корчагина К.В., Шестопалова Л.В. Подготовка клеточных культур к электронно-микроскопическому исследованию: методическое пособие. – Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т., 2011. – 49 с.

252 Instructions for use. https://docslide.net. 05.04.2019.

253 Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. – 2009. – № 4 (12). – С. 99–121.

254 Friedman G., Peddinghaus M., Ayan H., Fridman A., Balasubramanian M., Gutsol A., et al. Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air // Plasma chemistry and Plasma Processing. – 2006. – Vol. 26, № 4. – P. 425-442.

255 Ercan U.K., Wang H., Haifeng J., Fridman G., Brooks A.D., Joshi S.G. Nonequilibrium Plasma-Activated Antimicrobial Solutions are Broad-Spectrum and Retain their Efficacies for Extended Period of Time // Plasma processes and polymers. – 2013. – Vol. 10, № 6. – P. 544-555.

256 Rampersad S.N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays // Sensors. – 2012. – Vol. 12, № 9. – P. 12347-12360.

257 Pesta D., Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle // Methods Mol Biol. – 2012. – Vol. 810. – P. 25-58.

258 Gnaiger E. Polarographic oxygen sensors, the oxygraph and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function. In: Dykens JA, Will Y (eds) Mitochondrial dysfunction in drug-induced toxicity. – New York, 2008. – P. 327-352.

259 Пальцев М.А., Иванов А.А., Северин С.Е. Межклеточные взаимодействия. 2-е изд., перераб. и доп. – Москва, 2003. – 288 с.

260 Reutelingsperger C. P. M., van Heerde W. L. Annexin V, the regulator of phosphatidylserinecatalyzed inflammation and coagulation during apoptosis // Cell. Mol. Lafe Sci. – 1997. – Vol. 53, – № 6. – P. 527–532.

261 Vanags D. M., Coppola S., Burgess D. H. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis // Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271, – № 49. – P. 31075-31085.

262 Swairjo M. A., Concha N. O., Kaetzel M. A. et al. Ca(2+)-bridging mechanism and phospholipid head group recognidon in the membrane-binding protein annexin V // Nat. Struct. Biol. – 1995. – Vol. 2, – № 11. – P. 968-974.

263 George S. B. W., Liron B., Aristide C. ,Ramzi J. Khairallaha, and Lederera W. J. Mitochondrial calcium uptake. – Vol. 11, – № 26, – P. 10479-10486.

264 Panngom K., Lee S.H., Park D.H., Sim G.B., Kim Y.H., et al. Non-thermal plasma treatment diminishes fungal viability and up-regulates resistance genes in a plant host // PLoS One. - 2014. – Vol. 9, – № 6.

265 Жунусова А.С., Орынбаева З.С., Төлеуханов С.Т. Қуық асты безі метастатикалық ісік клеткаларының тіршілік қабілетіне төмен температуралық атмосфералық плазманың әсерін зерттеу // ҚазҰУ хабаршысы. Биология сериясы. – Алматы, 2015. – № 2/1 (64). – Б. 87-93.

266 Жунусова А.С. Термалды емес плазманың in vitro жағдайында адамның қуық асты без обыры клеткаларына (DU145) ісікке қарсы әсері // Жас

ғалымдар мен студенттердің Фараби әлемі атты халықаралық конференциясы.– Алматы; Қазақстан, 2014, сәуір 8-11. – Б. 28.

267 Жунусова А.С. Сүтқоректілер клеткаларына салқын плазманың әсері // Ғылым әлемі халықаралық студенттер мен жас ғалымдар ғылыми конференциясы. – Алматы; Қазақстан, 2013, сәуір 17-19. – Б. 75-76.

268 Medicago A.B. Phosphate buffered saline specification sheet. 2010. – P. 2.

269 Жунусова А.С. Метастатикалық қуық асты без ісік клеткаларға суық плазманың әсерін зерттеу // Студенттер мен жас ғалымдардың Фараби әлемі атты халықаралық ғылыми конференциясы. – Алматы; Қазақстан, 2015, сәуір 14-16. – Б. 24-25.

270 Zhunussova A.S., Vitol E.A, Polyak B., Tuleukhanov S., Brooks A.D., Sensenig R., Friedman G., Orynbayeva Z. Mitochondria-Mediated Anticancer Effects of Non-Thermal Atmospheric Plasma // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, № 6. – P. 1-15.

271 Zhunussova A.S. Non-thermal plasma treatment of PrEC normal and DU145 prostate cancer cell lines // IV Халықаралық Фараби оқулары. – Алматы; Қазақстан, 2017, сәуір 4-21. – Б. 37.

272 Жунусова А.С., Орынбаева З.С., Төлеуханов С.Т. Төмен температуралық плазма көмегімен қуық асты без ісік клеткаларының апоптозын индукциялау // ҚазҰУ хабаршысы. Экология сериясы. – Алматы, 2014. – № 3 (42). – Б. 371-377.

274 Жунусова А.С. Қуық асты без ісік клеткаларының энергетикалық метаболизміне төмен температуралық плазма әсерлерінің механизмдерін зерттеу // IV Халықаралық Фараби оқулары. – Алматы; Қазақстан, 2017, сәуір 4-21. – Б. 93-94.

275 Zhunussova A.S., Tuleuhanov S., Ahmad R., Polyak B., Brooks A., Friedman G., Orynbayeva Z. Effects of electrically generated non-thermal plasma on metabolism of metastatic prostate cancer cells // Bioelectrochemistry Gordon Research Conferences. – Biddeford; USA, 2014, July 5-6. – Poster №25.

276 Zhunussova A., Irgebayeva Zh., Sen B., Friedman L., Ossikbayeva S., Tuleukhanov S., Brooks A., Sensenig R., Orynbayeva Z. Tumor promoting activity of SLC13A3 in metastatic prostate cells // Fourth AACR International Conference on Frontiers in Basic Cancer Research. AACR. - Philadelphia; USA, 2015, October 23-26. - 76(3 Suppl):Abstract B07.

277 Hofer C., Laubenbacher C., Block T., Breul J., Hartung R., Schwaiger M. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography is useless for the detection of local recurrence after radical prostatectomy // European urology. – 1999. – Vol. 36, № 1. – P. 31–35.

278 Zhunussova A.S., Sen B., Friedman L., Tuleuhanov S., Brooks A., Sensenig R., Orynbayeva Z. Tumor microenvironment promotes dicarboxylic acid carrier-mediated transport of succinate to fuel prostate cancer mitochondria // American Journal of Cancer Research. – 2015. – Vol. 5, № 5. – P. 1665-1679.

279 Zhunussova A.S., Tuleuhanov S., Rai A., Polyak B., Brooks A., Friedman G., Orynbayeva Z. Non-thermal plasma modulates metastatic prostate cancer

homeostasis by targeting mitochondria metabolism // The 1st International Workshop on Plasma for Cancer Treatment. – Washington, DC; USA, 2014, March 25-26. – Poster №16.

280 Fridman A, Kennedy LA. Plasma Physics and Engineering. – Routledge: CRC Press, 2004. – 858 p.

281 Panov A., Dikalov S., Shalbuyeva N., Hemendinger R., Greenamyre J.T., Rosenfeld J. Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice // American journal of physiology Cell physiology. – 2007. – Vol. 292, № 2. – P. C708-718.

282 Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species // The Biochemical journal. – 2009. – Vol. 417, № 1. – P. 1-13.

283 Zhunussova A.S., Tuleuhanov S., Ahmad R., Polyak B., Brooks A., Friedman G., Orynbayeva Z. Non-thermal plasma modulates metastatic prostate cancer homeostasis by targeting mitochondria metabolism // Research Day 2014.– Philadelphia; USA, 2014, April 10. – BB-021. – P. 26.

284 Zhunussova A.S., Tuleuhanov S., Ahmad R., Polyak B., Brooks A., Friedman G., Orynbayeva Z. Effects of electrically generated non-thermal plasma on metabolism of metastatic prostate cancer cells // International Symposium on molecular medicine and infectious disease. Cancer biology and neoplastic disease. – Philadelphia; USA, 2014, June 16-20. – C11. – P. 61-62.

285 Starkov A.A., Fiskum G., Chinopoulos C., Lorenzo B.J., Browne S.E., Patel M.S., et al. Mitochondrial alphaketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. – 2004. – Vol. 24, № 36. – P. 7779-7788.

286 Hoffman D.L., Brookes P.S. Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions // The Journal of biological chemistry. – 2009. – Vol. 284, № 24. – P. 16236-16245.

287 Kumar B., Koul S., Khandrika L., Meacham R.B., Koul H.K. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype // Cancer research. – 2008. – Vol. 68, № 6. – P. 1777-1785.

288 Drose S. Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning // Biochimica et biophysica acta. – 2013. – Vol. 1827, № 5. – P. 578-587.

289 Ralph S.J., Moreno-Sanchez R., Neuzil J., Rodriguez-Enriquez S. Inhibitors of succinate: quinone reductase/Complex II regulate production of mitochondrial reactive oxygen species and protect normal cells from ischemic damage but induce specific cancer cell death // Pharmaceutical research. – 2011. – Vol. 28, № 11. – P. 2695-2730.

290 Quinlan C.L., Orr A.L., Perevoshchikova I.V., Treberg J.R., Ackrell B.A., Brand M.D. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions // The Journal of biological chemistry. – 2012. – Vol. 287, № 32. – P. 27255-27264.

291 Lambert A.J., Brand M.D. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) // The Journal of biological chemistry. – 2004. – Vol. 279, № 38. – P. 39414-39420.

292 Muller F.L., Liu Y., Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane // The Journal of biological chemistry. – 2004. – Vol. 279, № 47. – P. 49064-49073.

293 Arjunan K.P., Friedman G., Fridman A., Clyne A.M. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma induces angiogenesis through reactive oxygen species // Journal of the Royal Society, Interface. – 2012. – Vol. 9, № 66. – P. 147-157.

294 Williams G.S., Boyman L., Chikando A.C., Khairallah R.J., Lederer W.J. Mitochondrial calcium uptake // Proc Natl Acad Sci USA. – 2013. – Vol. 110, № 26. – P. 10479-10486.

295 Жунусова А.С., Орынбаева З.С., Төлеуханов С.Т. Қышқыл pH жағдайында DU145 қуық асты безі ісік клеткаларының тыныс алу қызметін зерттеу // ҚазҰУ хабаршысы. Биология сериясы. – Алматы, 2015. – № 3 (65). – Б. 306-312.

296 Kaambre T., Chekulayev V., Shevchuk I., Karu-Varikmaa M., Timohhina N., Tepp K., Bogovskaja J., Kutner R., Valvere V., Saks V. Metabolic control analysis of cellular respiration in situ in intraoperational samples of human breast cancer // J Bioenerg Biomembr. – 2012. – Vol. 44, № 5. – P. 539-558.

297 Lan A., Lagadic-Gossmann D., Lemaire C., Brenner C., Jan G. Acidicextracellular pH shifts colorectal cancer cell death from apoptosis tonecrosis upon exposure to propionate and acetate, major end-productsof the human probiotic propionibacteria // Apoptosis. – 2007, – Vol. 12, №3. – P. 573-591.

298 Brennan J.P., Berry R.G., Baghai M., Duchen M.R., Shattock M.J. FCCP is cardioprotective at concentrations that cause mitochondrial oxidation without detectable depolarisation // Cardiovasc Res. – 2006. – Vol. 72, № 2. – P. 322-330.

299 Webb R.C., Bohr D.F. Mechanism of membrane stabilization by calcium in vascular smooth muscle // Am J Physiol. – 1978. – Vol. 235, № 5. – P. C227-232.

300 Gnaiger E., Kuznetsov A.V., Rieger G., Amberger A., Fuchs A., Stadlmann S., Eberl T., Margreiter R. Mitochondrial defects by intracellular calcium overload versus endothelial cold ischemia/reperfusion injury // Transpl Int. – 2000. – Vol. 13, Suppl 1. – P. S555- S557.

301 (Ed.) QAA. Dicarboxylic Acids: Advances in Research and Application. eBook 2013; Scholarly Editions, Atlanta USA.

302 Bellance N., Lestienne P., Rossignol R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis // Front Biosci (Landmark Ed). – 2009. – Vol. 14. – P. 4015-4034.

303 Selak M.A., Armour S.M., MacKenzie E.D., Boulahbel H., Watson D.G., Mansfield K.D., Pan Y., Simon M.C., Thompson C.B., Gottlieb E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase // Cancer Cell. – 2005. – Vol. 7, № 1. – P. 77-85.

304 Isaacs J.S., Jung Y.J., Mole D.R., Lee S., Torres-Cabala C., Chung Y.L., Merino M., Trepel J., Zbar B., Toro J., Ratcliffe P.J., Linehan W.M., Neckers L. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability // Cancer Cell. – 2005. – Vol. 8, № 2. – P. 143-153.

305 Montero J., Morales A., Llacuna L., Lluis J.M., Terrones O., Basanez G., Antonsson B., Prieto J., Garcia-Ruiz C., Colell A., Fernandez-Checa J.C. Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68, № 13. – P. 5246-5256.

306 Mulligan C., Fitzgerald G.A., Wang D.N., Mindell J.A. Functional characterization of a Na+-dependent dicarboxylate transporter from *Vibrio cholerae* //J Gen Physiol. – 2014. – Vol. 143, № 6. – P. 745-759.

307 Babcock D.F., First N.L., Lardy H.A. Transport mechanism for succinate and phosphate localized in the plasma membrane of bovine spermatozoa // J Biol Chem. – 1975. – Vol. 250, № 16. – P. 6488-6495.

308 Kekuda R., Wang H., Huang W., Pajor A.M., Leibach F.H., Devoe L.D., Prasad P.D., Ganapathy V. Primary structure and functional characteristics of a mammalian sodium-coupled high affinity dicarboxylate transporter // J Biol Chem. – 1999. – Vol. 274, № 6. – P. 3422-3429.

309 Kaufhold M., Schulz K., Breljak D., Gupta S., Henjakovic M., Krick W., Hagos Y., Sabolic I., Burckhardt B.C., Burckhardt G. Differential interaction of dicarboxylates with human sodium-dicarboxylate cotransporter 3 and organic anion transporters 1 and 3 // Am J Physiol Renal Physiol. – 2011. – Vol. 301, № 5. – P. 1026-1034.

310 Inoue K., Zhuang L., Maddox D.M., Smith S.B., Ganapathy V. Structure, function, and expression pattern of a novel sodium-coupled citrate transporter (NaCT) cloned from mammalian brain // J Biol Chem. – 2002. – Vol. 277, № 42. 277: – P. 39469-39476.

311 Moreno-Sanchez R., Rodriguez-Enriquez S., Marin-Hernandez A., Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells // FEBS J. – 2007. – Vol. 274, № 6. – P. 1393-1418.

312 Ward P.S., Thompson C.B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate // Cancer Cell. – 2012. – Vol. 21, № 3. – P. 297-308.

313 Ralph S.J., Rodriguez-Enriquez S., Neuzil J., Moreno-Sanchez R. Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger // Mol Aspects Med. – 2010. – Vol. 31, № 1. – P. 29-59.

314 Seyfried T.N., Flores R.E., Poff A.M., D'Agostino D.P. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics // Carcinogenesis. – 2014. – Vol. 35, № 3. – P. 515-527.

315 Martinez-Outschoorn U.E., Lin Z., Trimmer C., Flomenberg N., Wang C., Pavlides S., Pestell R.G., Howell A., Sotgia F., Lisanti M.P. Cancer cells metabolically "fertilize" the tumor microenvironment with hydrogen peroxide,

driving the Warburg effect: implications for PET imaging of human tumors // Cell Cycle. – 2011. – Vol. 10, № 15. – P. 2504-2520.

316 Cardaci S., Ciriolo M.R. TCA Cycle Defects and Cancer: When Metabolism Tunes Redox State // Int J Cell Biol. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1-9.

317 Wallace D.C., Fan W. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics // Mitochondrion. – 2010. – Vol. 10, № 1. – P. 12-31.

318 Costello L.C. Franklin R.B. Concepts of citrate production and secretion by prostate. 1. Metabolic relationships // Prostate. – 1991. – Vol. 18, № 1. – P. 25-46.

319 Grassl S.M., Heinz E., Kinne R. Effect of $K^+$ and $H^+$ on sodium/citrate cotransport in renal brush-border vesicles // Biochim Biophys Acta. – 1983. – Vol. 736, № 2. – P. 178-188.

320 Ross B.D., Bhattacharya P., Wagner S., Tran T., Sailasuta N. Hyperpolarized MR imaging: neurologic applications of hyperpolarized metabolism // AJNR Am J Neuroradiol. – 2010. – Vol. 31, № 1. – P. 24-33.

## ҚОСЫМША А

Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау Министрлігінің Қазақ онкология және радиология ғылыми-зерттеу институтына DU145 қуық асты безі ісігі клеткаларының әсер ету механизмі бойынша төмен температуралық плазманы қолдану арқылы жаңа әдістемені енгізу актісі

КазНИИ Онкологии и Радиологии
КАНЦЕЛЯРИЯ
Шығыс/Исх. № 02-11/1326
«30» 11 2018 ж./г.

**АКТ**

внедрения новой методики с использованием низкотемпературной плазмы на механизм действия раковых клеток простаты DU145

в Казахском НИИ онкологии и радиологии МЗ РК

**Наименование предложения:** Рекомендация к применению низкотемпературной плазмы при лечении рака простаты (методика и методы исследования применялись в работе докторанта Жунусовой А.С. на тему: «Механизмы изменения энергетического метаболизма раковых клеток простаты при действии низкотемпературной плазмы»).

**Форма внедрения:** Проведение презентации методики, используемой в диссертационной работе в центре онкоурологии АО «Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии» МЗ РК, где Жунусова А.С. представила способ индукции апоптоза в раковых клетках простаты с помощью низкотемпературной плазмы и методику определения цитотоксического действия низкотемпературной плазмы *in vitro*.

**Ответственные за внедрение:** докторант кафедры биофизики и биомедицины, факультета биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби – Жунусова А.С.; д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биофизики и биомедицины КазНУ им. аль-Фараби - Тулеуханов С.Т.; к.м.н., заведующий центра онкоурологии КазНИИ онкологии и радиологии МЗ РК – Нургалиев Н.С.; д.б.н., ученый секретарь КазНИИ онкологии и радиологии МЗ РК – Гончарова Т.Г.

**Эффективность внедрения:** Способ позволяет разрушать раковые клетки простаты путем индукции апоптоза (без образования некроза и повреждения здоровых клеток). Использование цитотоксических методов с применением флуоресцентного красителя Аламар синий, при проведении экспериментальных исследований, даст возможность определять метаболические выжившие клетки при воздействии низкотемпературной плазмы.

**Срок внедрения:** 16.11.2018 г.

Ответственные за внедрение: Жунусова А.С.

Тулеуханов С.Т.

Нургалиев Н.С.

Гончарова Т.Г.

"ҚАЗАҚ ОНКОЛОГИЯ ЖӘНЕ РАДИОЛОГИЯ ҒЫЛЫМИ-ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫ" ЖШС
№28-2018

КАДРЛАР РЕСУРСТАРЫН ДАМЫТУ БӨЛІМІ

# ҚОСЫМША Ә

Оқу процесіне аяқталған ғылыми-зерттеу жұмысын енгізу туралы актісі

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**
**КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЬ-ФАРАБИ**

**СОГЛАСОВАНО**
Проректор по научно-
инновационной деятельности
_____ Рамазанов Т.С.
«24» октября 2018 г.

**УТВЕРЖДАЮ**
Проректор по учебной работе,
председатель комиссии
_____ Хикметов А.К.
«24» октября 2018 г.

**АКТ**
**о внедрении завершенной научно-исследовательской работы в учебный процесс**

**Комиссия Казахского национального университета имени аль-Фараби в составе:** председатель: Хикметов А.К. - проректор по учебной работе, члены: директор департамента по академическим вопросам Мухитдинова Т.М., директор департамента по науке и инновационной деятельности Мухамбетжанов С.К., начальник УМРиОТ Саксенбаева Ж.С., декан факультета биологии и биотехнологии Заядан Б.К., председатель методбюро факультета биологии и биотехнологии Кулбаева М.С., заведующий кафедрой биофизики и биомедицины Тулеуханов С.Т. составили настоящий акт о том, что в 2017/2018 учебном году на кафедре биофизики и биомедицины внедрены результаты научно-исследовательской работы докторанта 2012-2015 гг. обучения Жунусовой А.С. на тему: «Исследование механизмов действия низкотемпературной атмосферной плазмы на раковые клетки», выполненной по теме PhD «Механизмы изменения энергетического метаболизма раковых клеток простаты при действии низкотемпературной плазмы» научный руководитель д.б.н., профессор: Тулеуханов С.Т.

| № п/п | Форма внедрения (наименование нового курса, спецкурса, раздела лекций, лаб.работы, установки, учебные пособия и т. п.); курс, специальность | Объем внедрения (количество работ, лекционных часов) | Краткое содержание внедренной работы |
|---|---|---|---|
| 1 | Результаты НИР «Исследование механизмов действия низкотемпературной атмосферной плазмы на раковые клетки» внедрены в курс «Физиолого-биофизические механизмы действия биоактивных веществ на организм», 3 кредита, 2 курс магистратуры по специальности 6М060700 - Биология. | Лекции - 2 часа. «Механизмы воздействия нетермальной плазмы на энергетический метаболизм клеток рака простаты». | Установлено метаболические особенности митохондрий рака простаты на уровне целостной клетки в сравнении с нормальными клетками простаты при воздействии низкотемпературной атмосферной плазмы. |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | Семинар - 2 часа. «Механизмы индукции апоптоза раковых клеток простаты при воздействии низкотемпературной плазмы». | Разработан метод индукции апоптоза раковых клеток простаты путем воздействия на энергетический метаболизм митохондрий клеток. |

Материалы к настоящему акту рассмотрены на заседании методического бюро факультета биологии и биотехнологии (протокол № 3 от «24» 10 2018 г.)

**Члены комиссии:**

Директор департамента по академическим вопросам _____ Мухитдинова Т.М.

Директор департамента по науке и инновационной деятельности работе _____ Мухамбетжанов С.К.

Начальник УМРиОТ _____ Саксенбаева Ж.С.

Декан факультета биологии и биотехнологии _____ Заядан Б.К.

Председатель методбюро факультета биологии и биотехнологии _____ Кулбаева М.С.

Заведующий кафедры Биофизики и биомедицины _____ Тулеуханов С.Т.