

Жунусова Айгуль Сагиндыковнаның

«6D070100 – Биотехнология» мамандығы бойынша философия докторы (PhD) дәрежесін алу үшін дайындалған диссертациясына

АНДАТПА

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

Жұмыстың жалпы сипаттамасы. Диссертациялық жұмыс төмен температуралық плазма әсерінен қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткаларының энергетикалық метаболизмі өзгеруінің клеткалық механизмдерін зерттеуге арналған.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Қуық асты безі ісігі ауруы дүние жүзі бойынша ерлер арасында өлімге ұшырағандардың саны жағынан өкпе және тыныс алу жолдары ісіктерінен кейін 2-ші орынды (*Siegel R.L., et al., 2018*), ал ҚР бойынша өкпе, асқазан және тері ісіктерінен кейін 4-ші орынды алады (*Қайдарова Д.Р. және т.б., 2017*). Бұл баяу өсетін ісік, бірақ көптеген басқа да ісік түрлері сияқты, метастатикалық формаға жеткен жағдайда әдетте емделмейтін ісік болып саналады (*Howlader N., et al., 2015*). Қазіргі қолданыстағы химиялық терапия әдістерінің елеулі жанама әсерлері бар және соңғы сатыдағы ауруларды емдеуде қауқарсыз болып табылады. Сондықтан, химиялық және сәулелік терапияға резистенттілікті жеңіл қалыптастыратын ісік түрлерін емдеу үшін жаңа медициналық тәсілдер қажет (*Zhang W., et al., 2015*). Атмосфералық қысымды төмен температуралық плазма қазіргі таңда прокариоттық және эукариоттық клеткалар қызметінің модуляциясы үшін қолдануға болатындығы анықталды. Ісік терапиясында төмен температуралық плазма өңдеуінің 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 болып табылады. Бұл жұмыстың басты 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 (*Pannngom K., et al., 2013*). Дегенмен, плазманың жоғары дозалары клеткаішілік оттегінің белсенді түрлерінің (ОБТ) жаппай түзілуіне байланысты басқа да ісіктерде апоптоз процесін тудыратыны (*Kalghatgi S., et al., 2011; Fridman A., 2008*) және митохондриялар ОБТ негізгі клеткаішілік көздерінің бірі екені көрсетілген (*Starkov A.A., 2008*). Бұл мәліметтер митохондрияларға төмен температуралық плазма әсерлерінің механизмдерін анықтау арқылы ісікті емдеуде клиникалық маңызды әдістерді жетілдіруге айтарлықтай мүмкіндік бар екенін дәлелдейді.

Қалыпты клеткаларға әсер етпей, тек қатерлі ісік клеткаларына

бағытталған жаңа ісікке қарсы дәрі-дәрмек немесе терапиялық емдеу – ісік клеткаларын зерттеуде өзекті мәселе болып табылады. Клеткаларға селективті әсер етудің осындай түріне қол жеткізу өте қиын, сондықтан химиялық терапия мен сәулелік терапияның жанама әсерлері басты мәселе болып табылады. Бұл жұмыста метаболизімі әртүрлі болып келетін қуық асты безінің қалыпты және ісік клеткаларына төмен температуралық плазмалық өңдеу нәтижелеріне салыстырмалы талдау жүргізілген.

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

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 Accuri C6*), конфокалды микроскопия (*Olympus FluoView*), жоғары дәлдікті респирометрия (*Oroboros Oxygraph-2k*), флуоресцентті спектроскопия (*BioTek Synergy 4*), микроскопия (*Leica MZI6F, Motic AE2000*), спектрофотометрия (*NanoDrop*), плазма өндіру әдісі (*Quinta*), Вестерн блот, ПТР және статистикалық талдау әдістері (*GraphPad Prism*) пайдаланылды.

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 мембранасы 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 метаболитикалық 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.

Зерттеудің 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 төзімділігін орнықтыратын механизмдерді 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 рН 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).

Сонымен қатар, алынған нәтижелер медициналық биология бағытындағы жоғары оқу орындарының студенттеріне, магистранттары мен докторанттары 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).

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 рН жағдайында сукцинаттың белсенді тотығуы жүрді. Сукцинаттың тасымалдануы плазмалық мембрананың Na^{+} -тәуелді дикарбоксилатты тасымалдаушысы - NaDC3 арқылы болатыны анықталды.

Зерттеудің негізгі нәтижелері және тұжырымдары:

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 АҰФ қосқанда кальций иондарының тербелістері пайда болды. Төмен температуралық плазма арқылы өңделген PBS ерітіндісінде инкубацияланған PrEC қалыпты клеткаларына АҰФ 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 рН деңгейінің 6,8 жағдайында жүзеге асатындығы көрсетілді. Сондай-ақ, ісік клеткаларында сукцинаттың тасымалдануы NaDC3 тасымалдаушысы арқылы өтетіндігі анықталды.

Автордың жеке үлесі. Зерттелетін мәселе бойынша әдеби деректерді талдау, тәжірибелік зерттеулерді жүргізу, нәтижелерді статистикалық өңдеу және талдау, диссертацияны жазу мен қол жазбаны рәсімдеу автордың жеке қатысуымен 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.

Жұмыстың сыннан өтуі. Диссертациялық жұмыстың материалдары 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.