

УСИЛЕНИЕ ПРОТИВОРАКОВОГО ЭФФЕКТА ПРИ СОВМЕСТНОЙ ОБРАБОТКЕ КЛЕТОК СТРУЕЙ ХОЛОДНОЙ АТМОСФЕРНОЙ ПЛАЗМЫ И НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

© 2024 г. И. В. Швейгерт^{a,*}, Д. Э. Закревский^{a,b,c}, Е. В. Милахина^{a,b,c}, П. П. Гугин^{a,b},
М. М. Бирюков^{a,d}, А. А. Полякова^{a,d}, Н. В. Крячкова^{a,d}, Е. А. Горбунова^{a,d},
А. В. Епанчинцева^d, И. А. Пышная^d, О. А. Коваль^{a,d}

^a Институт теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН, Новосибирск, Россия

^b Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск, Россия

^c Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

^d Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: ivschweigert@gmail.com

Поступила в редакцию 02.08.2024 г.

После доработки 28.08.2024 г.

Принята к публикации 05.09.2024 г.

Выбор эффективных и биологически безопасных режимов работы холодной атмосферной плазменной струи (ХПС) имеет решающее значение для разработки противораковой терапии на основе ХПС. В эксперименте и численном моделировании, изменяя длительность импульса положительного импульсного напряжения, были найдены оптимальные режимы ХПС с регулярным распространением стримеров и максимальным током разряда при температуре $T < 42^\circ\text{C}$. В этих режимах ХПС существенно подавляет жизнеспособность раковых клеток. Показано, что добавление наночастиц золота увеличивает цитотоксический эффект плазменной струи и снижает жизнеспособность эпителиоподобной аденокарциномы легкого NCI-H23, аденокарциномы легкого A549, аденокарциномы молочной железы BrCC4e-134 и клеток увеальной меланомы uMell. Модифицированные полиэтиленгликолем наночастицы золота с флуоресцентными метками использовались для визуализации поглощения наночастиц клетками. Продemonстрировано, что ХПС стимулирует проникновение наночастиц в клетки, когда их добавляли в среду с клетками непосредственно перед воздействием ХПС или сразу после, что свидетельствует о кратковременном увеличении проницаемости мембраны клеток.

Ключевые слова: холодная атмосферная плазменная струя, проникновение золотых наночастиц, импульсное напряжение, длительность импульса, оптимизация режимов

DOI: 10.31857/S0367292124110058, EDN: FBUYRR

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время низкотемпературная плазма атмосферного давления активно применяется в различных медицинских приложениях, в частности для подавления роста онкологических образований (см. обзоры [1, 2] и ссылки в них). Несмотря на различия в конструкциях источников плазмы и их эксплуатационных характеристик, были получены многообещающие результаты в доклинических исследованиях на различных моделях раковых образований и в клинических испытаниях с пациентами [3].

Воздействие холодной атмосферной плазмы является летальным для раковых клеток при повышенном энергокладе, но способствует пролиферации клеток и заживлению ран при небольших дозах обработки [4]. Стримеры в холодной плазменной струе (ХПС), генерируемые периодическим напряжением плазменного источника, образуют химически актив-

ные формы кислорода и азота (АФКА) в окружающем воздухе. В зависимости от концентрации АФКА с высокой реакционной способностью, воздействие холодной плазменной струи приводит либо к гибели клеток (при больших дозах), либо к ускорению процессов регенерации тканей (малые дозы).

Положительная селективность воздействия ХПС при обработке клеток одного гистологического происхождения (убиваются только раковые клетки, а здоровые не повреждаются) была продемонстрирована на десятках различных линий опухолевых клеток [5, 6]. “Летальные дозы” обработки ХПС для раковых клеток значительно ниже, чем для здоровых клеток, поэтому для конкретного типа рака возможно подобрать режимы генерации ХПС для селективного воздействия.

Подавление роста онкологических образований с использованием холодной газоразрядной плазмы часто комбинируется с препаратами химиотерапии, ин-

гибиторами ферментов, антителами, малыми интерферирующими РНК, а также с наночастицами различного типа. В 2009 г. [7] были опубликованы первые результаты воздействия ХПС и наночастиц золота (НЧЗ) на раковые клетки. Наночастицы золота являются одним из наиболее изученных, биосовместимых материалов, и часто используются совместно с холодной атмосферной плазмой [8–15]. Разработанные методики синтеза НЧЗ позволяют получить монодисперсные частицы заданного размера, а также присоединить к их поверхности молекулярные терапевтические комплексы. НЧЗ могут быть использованы для доставки лекарств при конъюгации с молекулярными терапевтическими препаратами, а также в качестве инструментов исследования.

Целью данной работы было изучение эффектов комбинированного воздействия холодной плазменной струи и НЧЗ на опухолевые клетки, а также исследование динамики проникновения наночастиц в клетки. В наших экспериментах ХПС инициируется в “высокодозных” режимах с низким нагревом биологической ткани, что является условиями применимости в противораковой терапии. Отметим, холодная плазменная струя формируется положительным импульсным либо синусоидальным напряжением в режимах, показавших максимальную эффективность обработки клеток [16–18].

Мы синтезировали и использовали НЧЗ без/с покрытием полиэтиленгликолем (PEG), а также конъюгированные с изотиоцианатом флуоресцеина, для визуализации проникновения НЧЗ.

2. ОПИСАНИЕ ПЛАЗМЕННОГО ИСТОЧНИКА, РАСЧЕТНОЙ МОДЕЛИ ПЛАЗМЫ, СИНТЕЗА ЗОЛОТЫХ ЧАСТИЦ И МЕТОДОВ АНАЛИЗА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК

2.1. Устройство, генерирующее плазменную струю

Газоразрядная ячейка — это цилиндрический диэлектрический канал длиной 10 см с внутренним диаметром 1 см (рис. 1). В центре канала помещен медный электрод в виде стержня длиной 5 см и диаметром 0.2 см, к которому подается напряжение U . На выходе из канала вставлен диэлектрический капилляр с внутренним диаметром 0.23 см и длиной 0.5 см. Подробное описание источника плазмы можно найти в [19, 20].

Инициирование струи гелиевой плазмы осуществлялось с помощью генератора синусоидального напряжения с амплитудой $U = 3.3\text{--}3.5$ кВ при фиксированной частоте $f_U = 50$ кГц или генератором униполярных положительных импульсов с регулируемой частотой повторения $f_U = 1\text{--}40$ кГц и амплитудой 3.8 кВ и 4.2 кВ. Длительность импульсов τ варьировалась от 5 мкс до 16 мкс. Амплитуда напряжения U была ограничена для обеспечения безопасных условий воздействия ХПС на живые объекты. Измерения тока проводились датчиком, расположенным на рас-

стоянии $z = 2.5$ см от сопла, перпендикулярно оси распространения плазменной струи, и представляющим собой коллектор (плоский металлический электрод), который заземлялся через шунт. Это позволило измерить частоту и амплитуду импульсов тока на коллекторе. Во всех наших экспериментах заземленный металлический коллектор использовался в качестве дополнительного электрода для усиления электрического поля в головке стримера. Это приводило к интенсификации генерации активных радикалов в зоне контакта ХПС с мишенью по сравнению со случаем с мишенью под плавающим потенциалом (см. [19, 21]). Расстояние от сопла до мишени 2.5 см было выбрано таким образом, чтобы плазменная струя приближалась к мишени, обеспечивая максимальную генерацию ОН при заданном расходе газа, и нагрев мишени был меньше 42°C . В экспериментах использовались два типа мишеней: пластина Al_2O_3 толщиной 0.1 см в качестве тестовой мишени и клетки в среде. Во всех случаях заземленный электрод находился под мишенью. Поток гелия составлял $v = 9$ л/мин. Наши предыдущие эксперименты [19] показали, что для геометрии источника плазменной струи, использованной в данном исследовании, ламинарный режим течения газа наблюдался при расходе v до 12 л/мин. При дальнейшем увеличении v поток становится неустойчивым. Мы также показали, что максимальная интенсивность люминесценции радикалов ОН ($\lambda = 309$ нм) наблюдается при $v = 6\text{--}9$ л/мин.

2.2. Детали численного моделирования

Численное моделирование зажигания разряда и динамики распространения стримеров для условий эксперимента проводилось в рамках гидродинамической модели с использованием авторского кода 2DPlasmaNovH. Физическая модель и уравнения, описывающие динамику стримерного пробоя, подробно описаны в [22]. Система уравнений, описывающая динамику газового разряда, включает уравнения непрерывности для электронов, ионов и средней энергии электронов, а также уравнения Пуассона для напряженности электрического поля. Расчет поверхностного заряда на внутренней поверхности диэлектрической газоразрядной трубки проводится на основе интегрирования по времени потоков электронов и ионов на стенку.

Для анализа закономерностей распространения стримеров (комбинация коротких и длинных стримеров в плазменной струе) моделирование динамики стримеров проводилось для нескольких десятков импульсов напряжения. Поэтому мы использовали упрощенную модель, в которой рассматривалась только гелиевая газовая струя без примеси азота или кислорода. В большинстве наших экспериментов скорость гелиевого газа составляет 30 м/с ($v = 9$ л/мин), что оправдывает наше упрощение. Согласие между рассчитанными и измеренными

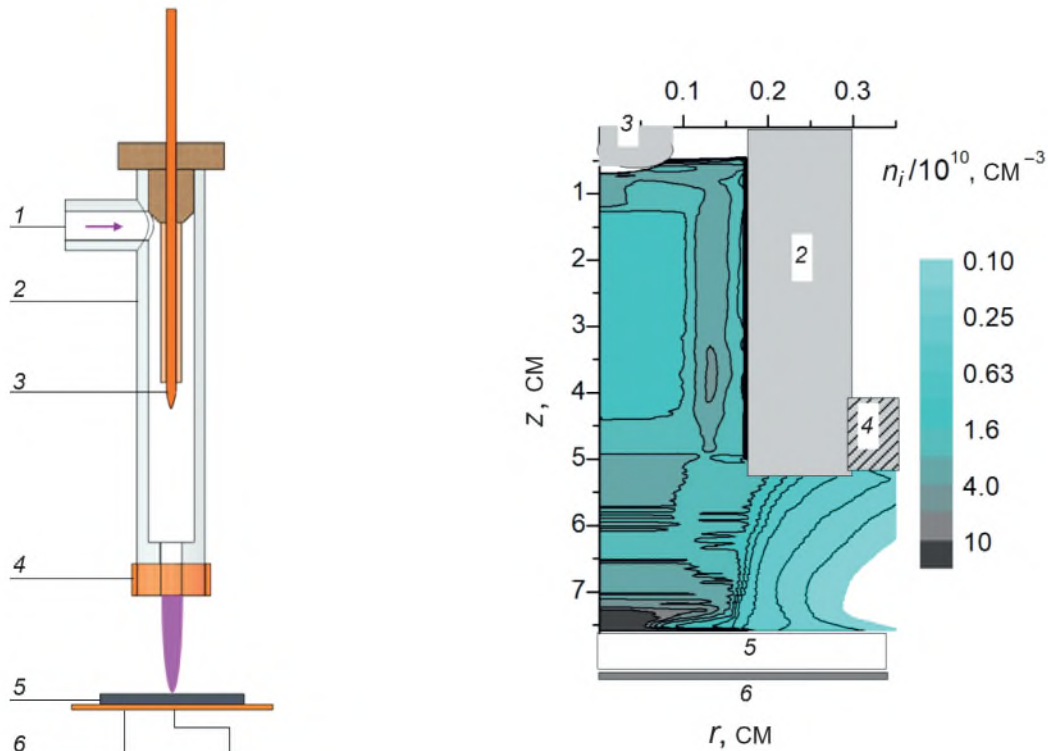


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для генерации холодной атмосферной плазменной струи (а) и расчетная область с распределением плотности ионов в момент касания стримером подложки (б): $U = 3.8$ кВ и $f_U = 30$ кГц, I — ввод газа; 2 — диэлектрическая трубка; 3 — потенциальный внутренний электрод; 4 — заземленный внешний электрод; 5 — мишень; 6 — дополнительный заземленный электрод.

тока разряда вблизи поверхности, а также характеристики распространения стримеров подтверждают применимость модели. Для расчета фотоионизации использовалась модель, разработанная в [22]. В экспериментах [22] изображения стримеров представляли собой светящиеся пятна радиусом примерно 0.2–0.25 см вокруг головки стримера. Из этих наблюдений следовало, что характерное время испускания фотонов возбужденными атомами меньше характерного времени распространения стримера, и что характерная длина фотоионизации меньше 0.25 см. Скорость фотоионизации вокруг головки стримера задавалась из расчета скорости возбуждения атомов гелия в головке стримера. Предполагалось, что все фотоны от возбужденных состояний атомов гелия ионизируют воздух.

Численный расчет динамики стримерного пробоя проводился для условий эксперимента. В модельной плазменной ячейке (рис.1б) расстояние между U -электродом и кольцевым заземленным электродом равняется 4.5 см, а расстояние между соплом и диэлектрической пластиной — 2.5 см. Радиус U -электрода под напряжением, расположенном в диэлектрическом канале, — 0.1 см. Размеры расчетной

области по $r = 7$ см и по $z = 7.8$ см. В численном моделировании расчет динамики разряда и распространения стримеров проводился непрерывно в течение 100–400 мкс (5–20 импульсов напряжения). В расчетном коде шаг по времени выбирался автоматически из расчетов изменения проводимости плазмы.

2.3. Синтез и свойства наночастиц золота

Для нашего исследования были синтезированы сферические золотые наночастицы двух размеров (NP-7 и NP-13), проведена модификация их поверхности полиэтиленгликолем (NP-PEG-7 и NP-PEG-13) и присоединена флуоресцентная метка (NP-PEG-FAM-7 и NP-PEG-FAM-13). Все полученные наноконструкции характеризовали методом гель-электрофореза, просвечивающей электронной микроскопией (ТЕМ), спектрофотометрическим методом с помощью спектрофотометра UV-2100 и методом динамического светорассеяния (DLS) с помощью Zetasizer Nano ZS (рис. 2).

Наночастицы NP-7 синтезировали согласно [23], используя в качестве стабилизатора поливинилпирролидон, и NP-13 — методом цитратного восстановления согласно [24]. Эти химические подходы позволяют получить монодисперсные суспензии наноча-

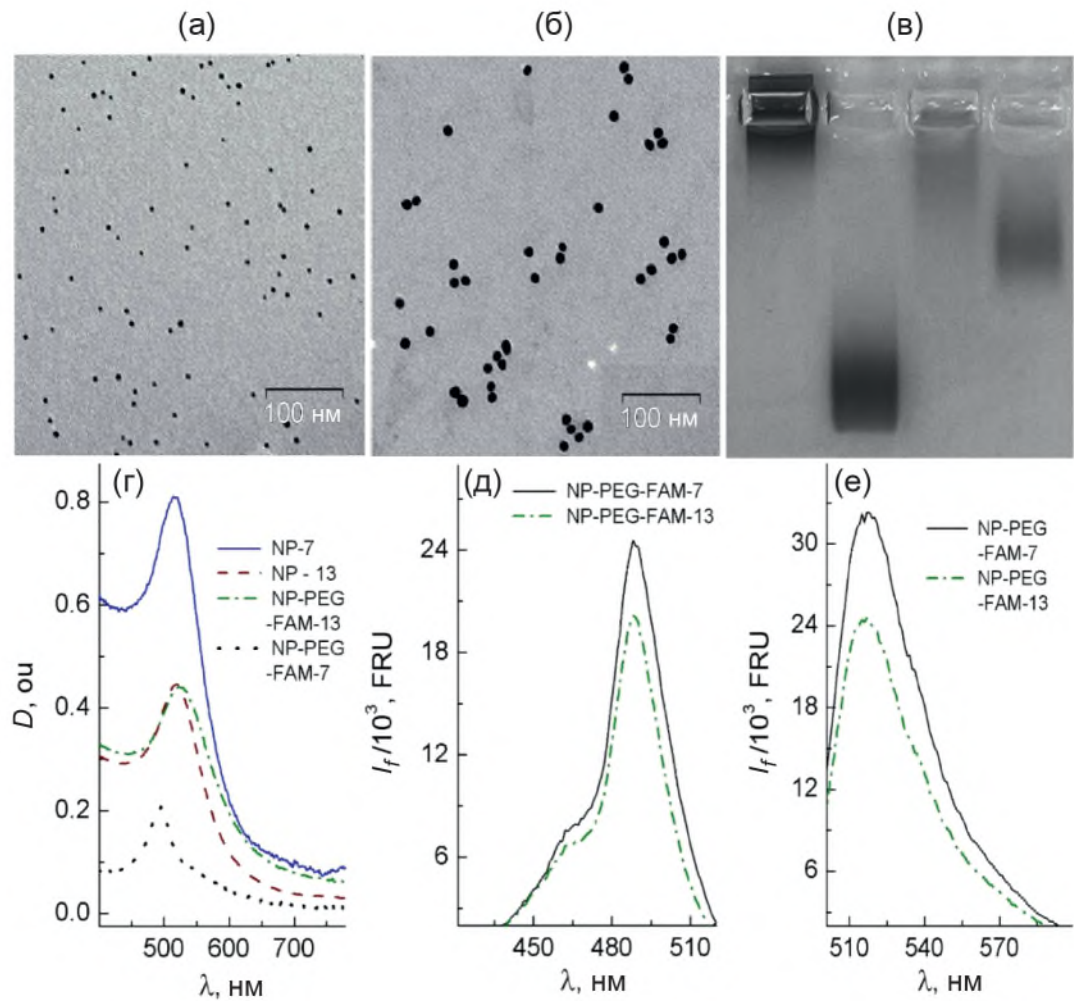


Рис. 2. Изображения просвечивающей электронной микроскопии NP-7 (а), NP-13 (б). Длина масштабных полос соответствует 100 нм. Электрофоретическое сравнение NP-13 (линия 1), NP-PEG-FAM-13 (линия 2), NP-7 (линия 3), NP-PEG-FAM-7 (линия 4) (в). Концентрация NP составляла 100 нМ. Оптические спектры адсорбции (г), спектры излучения возбуждения (д), эмиссионные спектры полученных комплексов НЧ (е). Обозначения: D — оптическая плотность, ou — оптические единицы, I_f — интенсивность флуоресценции, FRU — относительные единицы флуоресценции.

стиц заданного размера с минимальными отклонениями (рис. 2а, б). Для модификации NP мы использовали полиэтиленгликоль (Mr 3.2 kDa), содержащий тио- (SH) и карбоксильную группы (COOH). Первая группа позволяет ковалентно присоединить полиэтиленгликоль (PEG) к наночастицам золота, вторая может быть использована для ковалентного присоединения в состав нашей конструкции флуоресцентной метки или направляющей молекулы. Мы применили флуоресцеин (FAM) как метку для визуализации проникновения всей наноконструкции в клетки. Наличие модификаций на поверхности NP приводит к увеличению электрофоретической подвижности соответствующей наноконструкции (рис. 2в). Максимумы спектров оптического поглощения исходных наночастиц соответствовали 520 нм (рис. 2г). При этом интенсивность сигнала флуоресценции полученных конструкций NP-PEG-FAM-7 и NP-PEG-FAM-13 сопоставима (рис. 2в, д, е). Концентрацию NP-13 и NP-7 рассчитывали по поглощению при 520 нм,

Таблица 1. Гидродинамический диаметр и поверхностный потенциал нанокомплексов

Обозначение	D_h , нм	ζ -потенциал, мВ
NP-13	19.0 ± 0.5	-30.3 ± 4.9
NP-PEG-FAM-13	36 ± 16	-48 ± 1
NP-7	24.1 ± 18.4	-7.6 ± 1.7
NP-PEG-FAM-6	98.6 ± 57.7	-16.9 ± 2.8

используя известные параметры для частиц разных размеров [25]. Интенсивность флуоресценции образцов, содержащих FAM измеряли с помощью прибора Clariostar (BMG Labtech, Ортенберг, Германия).

Измеренные гидродинамический диаметр D_h и ζ -потенциал полученных нанокомплексов приведены в табл. 1. Гидродинамический диаметр структур НЧ определяет их диффузию в жидкости, а ζ -потенциал характеризует поверхностный заряд.

2.4. Материалы и методы для изучения клеточных линий

Анализ жизнеспособности клеток. Для изучения цитотоксического эффекта совместного воздействия ХПС и наночастиц были выбраны линии раковых клеток, относящиеся к разным типам неоплазий: клетки аденокарциномы легкого A549, клетки аденокарциномы молочной железы BrCCh4e-134 [26] и клетки увеальной меланомы uMel1. Клетки линии были выбраны таким образом, чтобы время деления клеток было близким по значению (24 ± 5 ч). Клетки, достигшие 30% конфлюэнтности в 96-луночном планшете, обрабатывали ХПС, НЧ и наноконплексами. Жизнеспособность клеток определяли через 24 ч после облучения ХПС с помощью МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-yl]-2,5-дифенилтетразолия бромид), как было описано ранее [27, 28].

Анализ проникновения НЧ в клетки с помощью проточной цитометрии. Клетки выращивали в 96-луночных планшетах в стандартных условиях до обработки ХПС и НЧЗ. Перед анализом клетки отделяли от лунок с помощью TrypLETM Express (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, США) и промывали фосфатным буфером. Все анализы проводили на проточном цитометре FACSCantoII (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), а данные анализировали с помощью программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences). Первоначально клетки сортировали на основе прямого и бокового рассеяния, чтобы исключить мелкий мусор, и собирали десять тысяч событий из этой популяции. FАМ-позитивная популяция клеток (т. е. клеток с наночастицами) была обнаружена в канале флуоресценции FITC ($\lambda_{ex} = 491$ нм, $\lambda_{em} = 525$ нм).

3. РАЗЛИЧНЫЕ МОДЫ ГЕНЕРАЦИИ ПЛАЗМЕННОЙ СТРУИ

Правильный выбор режима воздействия ХПС является определяющим для эффективности обработки онкообразований. Цитотоксический эффект ХПС может отсутствовать или на 100% убивать раковые клетки в зависимости от выбора частоты и амплитуды напряжения. Ранее в наших исследованиях было показано, что интенсивность взаимодействия ХПС с мишенью является немонотонной функцией амплитуды и частоты напряжения [16, 17, 20].

Большинство разработанных источников плазмы для медицинских целей генерируют ХПС синусоидальным напряжением. Необходимые характеристики, такие как повышенная концентрация АФКА, низкое тепловыделение и большие электрические поля в голове стримера, у поверхности мишени, затруднительно реализовать при синусоидальном типе возбуждения ХПС. Ранее было показано [17, 18], что импульсное униполярное напряжение с варьируемой длительностью импульсов, позволяет существен-

но повысить концентрацию АФКФ при $T < 42^\circ\text{C}$ в зоне контакта.

ХПС имеет оптимальные характеристики, когда 1) стримеры касаются мишени в каждом цикле напряжения, 2) амплитуда тока вблизи мишени 5 (см. рис. 1) имеет максимально возможное безопасное значение и 3) температура в зоне контакта не превышает 42°C . Мы предполагаем, что максимальный цитотоксический эффект обработки клеток ХПС будет зависеть от регулярности распространения стримеров до мишени и возрастать с увеличением тока разряда вблизи обрабатываемой поверхности.

В эксперименте ХПС генерируется при повышенных напряжениях, $U = 3\text{--}4.5$ кВ, поскольку в некоторых линиях раковых клеток низкоэнергетическое воздействие может стимулировать деление опухолевых клеток [4]. При повышенных рабочих напряжениях большое электрическое поле в головке стримера “активирует” раковые клетки и способствует проникновению НЧ и химически активных радикалов в клетки [9, 29–31]. Понятие “активации” раковых клеток было введено в [32] и связано со значительным повышением чувствительности раковых клеток к АФКА после обработки ХПС. Предположительно, это может быть связано с изменениями в структуре мембраны клеток или экспрессии специфических белков в клетках, обработанных ХПС [32], однако до настоящего времени механизм, лежащий в основе активации клеток, неизвестен. Отметим, что при электропорации [33] используются большие электрические поля, которые могут вести к различным повреждениям биотканей.

ХПС состоит из стримеров, которые формируются у нагруженного стержневого электрода в каждом цикле напряжения и распространяются в направлении объекта воздействия. Сценарий установившегося распространения стримеров вне диэлектрического канала определяется амплитудой и частотой напряжения, а также фоновой концентрацией плазмы между соплом и объектом воздействия, поддерживаемой стримерами. Как правило, только часть стримеров достигает объекта воздействия, а остальные распадаются вблизи сопла плазменного источника. Отметим, что цитотоксичность воздействия ХПС увеличивается с ростом числа стримеров, достигающих обрабатываемого объекта, поскольку возрастает интегральная концентрация АФКА вблизи обрабатываемой поверхности.

Причиной, по которой некоторые стримеры не приближаются к мишени, является накопление квазинейтральной плазмы n_0 в зазоре между соплом и мишенью. Между импульсами напряжения плазма распадается за счет рекомбинации и дрейфово-диффузионных процессов. Когда выполняется условие $n_s \gg n_0$, (где n_s — концентрация плазмы в головке и n_0 — концентрация квазинейтральной плазмы между соплом и объектом) очередной стример до-

стигает поверхности объекта. В результате самоорганизации системы для разных U и f_U , ток I у поверхности объекта воздействия имеет частоту в N раз меньшую, чем частота приложенного напряжения, т. е. $f_I = f_U/N$, где $N = 1, 2, 3, \dots$. В работе [20] мы представили карту различных режимов распространения стримеров в зависимости от U и f_U для синусоидального напряжения.

Мы обнаружили, что для ХПС с синусоидальным напряжением (sin-ХПС) нагрев поверхности быстро увеличивается с ростом U и f_U . Например, при расходе гелия $\nu = 6$ л/мин с ростом U от 2.25 кВ до 3.8 кВ температура поверхности увеличивается со скоростью $20^\circ\text{C}/\text{кВ}$, и для $\nu = 9$ л/мин и $U = 2.25\text{--}4.2$ кВ со скоростью $15^\circ\text{C}/\text{кВ}$. Ранее в эксперименте [34] было показано, что температура зоны контакта снижается при обрезании синусоидального напряжения в положительной фазе. Поэтому мы используем ХПС с положительным импульсным напряжением и варьируемой длительностью импульсов, что позволяет пони-

зять нагрев в области контакта и повысить концентрацию АФКА.

3.1. Зажигание ХПС синусоидальным напряжением

Изменяя амплитуду и частоту напряжения, мы исследовали ХПС с синусоидальным напряжением (sin-ХПС), чтобы найти режим с максимальным током при $T < 42^\circ\text{C}$. Измерения и численное моделирование показали, что для sin-ХПС максимальный ток достигается при $U = 3.3\text{--}3.5$ кВ и частоте $f_U = 50$ кГц. В этом режиме только каждый четвертый стример достигает поверхности, т. е. частота касания стримера мишени $f_I = 50/4$ кГц (рис. 3а).

3.2. ХПС с импульсным положительным напряжением.

Влияние длительности импульсов напряжения на распространение стримеров

Для генерации ХПС импульсным напряжением (PP-ХПС) использовалось напряжение с амплитудой $U = 3.8\text{--}4.2$ кВ и частотой $f_U = 30$. При больших зна-

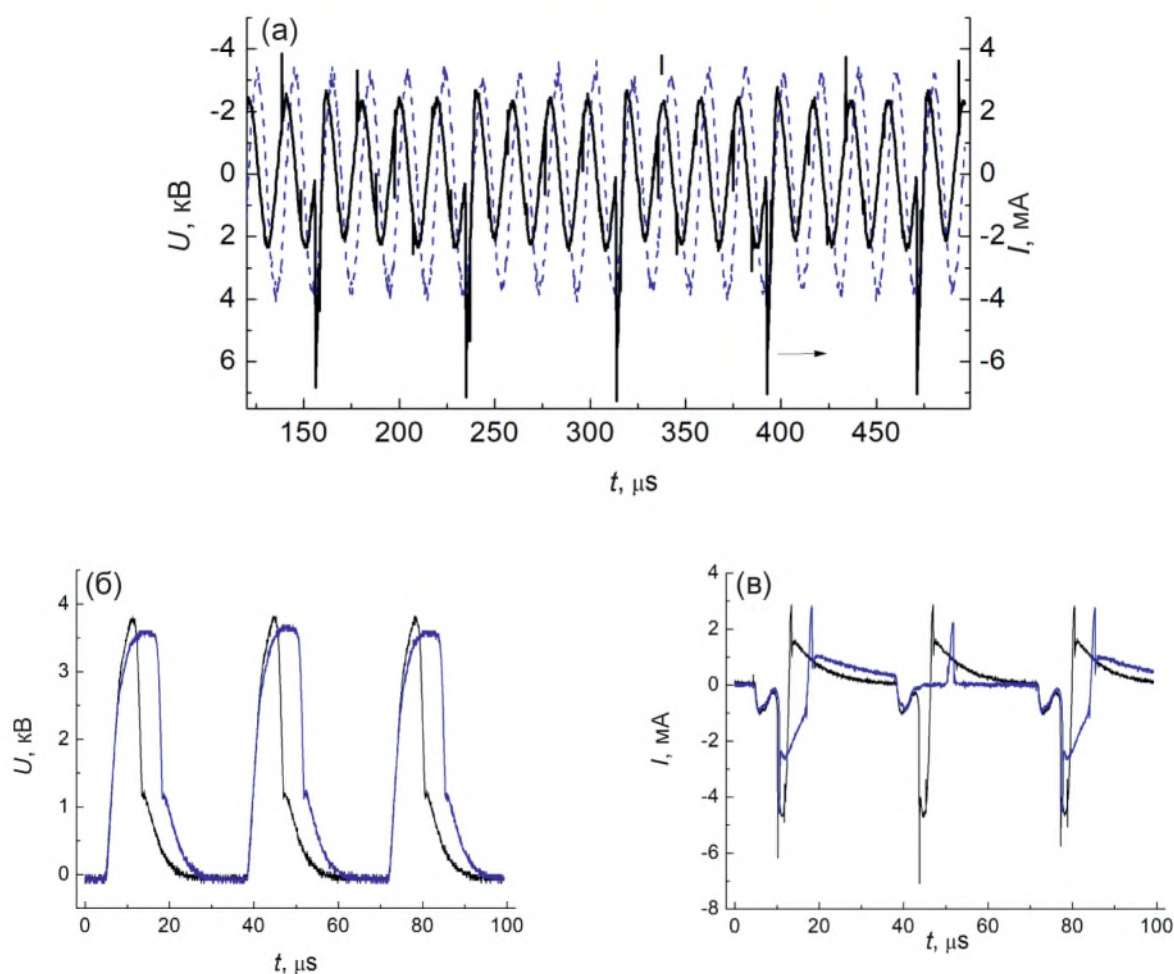


Рис. 3. Эксперимент: осциллограммы напряжения и тока для sin-ХПС с $U = 3.5$ кВ, $f_U = 50$ кГц и частотой тока на поверхности диэлектрической пластины $f_I = 50/4$ кГц (а); осциллограммы напряжения (б) и тока (в) для PP-ХПС с $U = 3.8$ кВ, $f_U = 30$ кГц и с длительностью импульсов напряжения $\tau = 7$ мкс (черные) и 14 мкс (синие кривые).

чениях U и f_U температура в зоне контакта плазмы с диэлектрической мишенью была выше 42°C . В эксперименте ток I вблизи мишени регистрируется во времени для определения частоты касания мишени стримерами. В численных расчетах распространение стримеров и ток вблизи мишени отслеживается в течение десятки циклов напряжения. Изменение длительности импульсов напряжения τ от 5 до 16 мкс позволило найти регулярное распространение стримеров и максимально допустимую амплитуду тока при низком нагреве поверхности ($T < 42^\circ\text{C}$).

Измерение тока проводилось на диэлектрической пластине с одновременным контролем температуры. Было показано, что при $\tau = 7\text{--}9$ мкс удается понизить нагрев зоны контакта и добиться регулярности распространения стримеров. Рассмотрим влияние длительности импульсов на характеристики стримеров. Для $\tau = 7$ мкс ток регистрируется в каждом цикле напряжения и амплитуда тока, измеренная у поверхности мишени $I = 4.8$ мА (рис. 3б, в). Увеличение τ до 14 мкс приводит к падению частоты и амплитуды тока примерно два раза, $f_I = f_U/2$ и $I = 2.2$ мА.

В численном моделировании в расчетной ячейке (см. рис. 1б) квазистационарное состояние достигается в течение нескольких циклов напряжения. Импульсы напряжения и рассчитанный ток проводимости I_c и ток смещения I_{dis} вблизи диэлектрической пластины для длительности импульсов $\tau = 7$ (PP-7) и 14 мкс (PP-14), а также профили тока при приближении стримера к поверхности воздействия показаны на рис. 4. Ток смещения рассчитывался по производной напряженности электрического поля вблизи поверхности мишени по времени. Для PP-7 ХПС рассчитанные токи практически одинаковы для каждого цикла напряжения. Для PP-14 ХПС ток вблизи мишени в два раза меньше по сравнению со случаем PP-7, когда стример приближается к мишени и практически равен нулю, когда стример не достигает поверхности мишени. На рис. 4г показаны z -профили тока при приближении стримера к диэлектрической пластине, полученные интегрированием тока по r -координате. Головка стримера определяется по максимальной скорости ионизации и максимальному току. Как и в экс-

перименте, расчетные стримеры в PP-7 ХПС касаются мишени в каждом цикле напряжения, $f_I = f_U$, а для PP-14 только каждый второй стример приближается к мишени, $f_I = f_U/2$. Рассчитанные амплитуды токов согласуются с данными эксперимента (рис. 3). На основании данных по току и регулярности распространения стримеров мы ожидаем более высокую цитотоксичность PP-ХПС с длительностью импульсов 7 мкс.

4. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК К СОВМЕСТНОЙ ОБРАБОТКЕ ХПС И NP-PEG

Для подавления жизнеспособности раковых клеток использовались режимы (см. раздел 3) с импульсным напряжением (PP-ХПС), $U = 4.2$ кВ, $f_U = 30$ кГц, с ожидаемыми эффектами: максимальным при длительности импульсов $\tau = 7$ мкс (PP-7) и с пониженным при $\tau = 14$ мкс (PP-14). Использовался также оптимальный режим с синусоидальным напряжением (sin-ХПС), $U = 3.3$ кВ, $f_U = 50$ кГц и $f_I = 50/4$ кГц. Расход гелия составлял $v = 9$ л/мин, а расстояние между соплом и мишенью $d = 25$ мм. Эффект совместной обработки ХПС и наночастиц золота и их комплексов (см. раздел 2.3) также был проанализирован для этих режимов. НЧ добавляли в среду с клетками до концентрации 20 нМ. Диаметр золотых наночастиц, 13 нм возрастал до 25 ± 5.4 нм при покрытии полиэтиленгликолем (PEG). Клетки инкубировали с НЧ-PEG в течение одного часа, после чего клетки подвергали воздействию ХПС. На рис. 5 показана жизнеспособность клеток A549, BrCCh4e-134 и uMell1, измеренная методом МТТ через 24 ч после воздействия. Цитотоксический эффект рассматривался для случаев, показанных в табл. 2.

Во всех случаях с добавлением наночастиц их концентрация составляла 20 нМ. Результаты воздействия для случаев N1-N7 показаны на рис. 5. Для всех клеточных линий наблюдается одна и та же тенденция: цитотоксический эффект возрастает по порядку от sin-ХПС, PP14-ХПС и PP7-ХПС. Добавление наночастиц усиливает цитотоксический эффект воздействия ХПС.

Таблица 2. Режимы холодной плазменной струи для воздействия на клетки.

№	ХПС, рабочее напряжение	Наночастицы	Обозначение
1	Нет	+	NP
2	Синусоидальное	-	0 NP, sin
3	Синусоидальное	+	20 нМ, sin
4	Импульсное, импульсы 7 мкс	-	0 NP, PP, 7 мкс
5	Импульсное, импульсы 7 мкс	+	20 нМ, PP, 7 мкс
6	Импульсное, импульсы 14 мкс	-	0 NP, PP, 14 мкс
7	Импульсное, импульсы 14 мкс	+	20 нМ, PP, 14 мкс

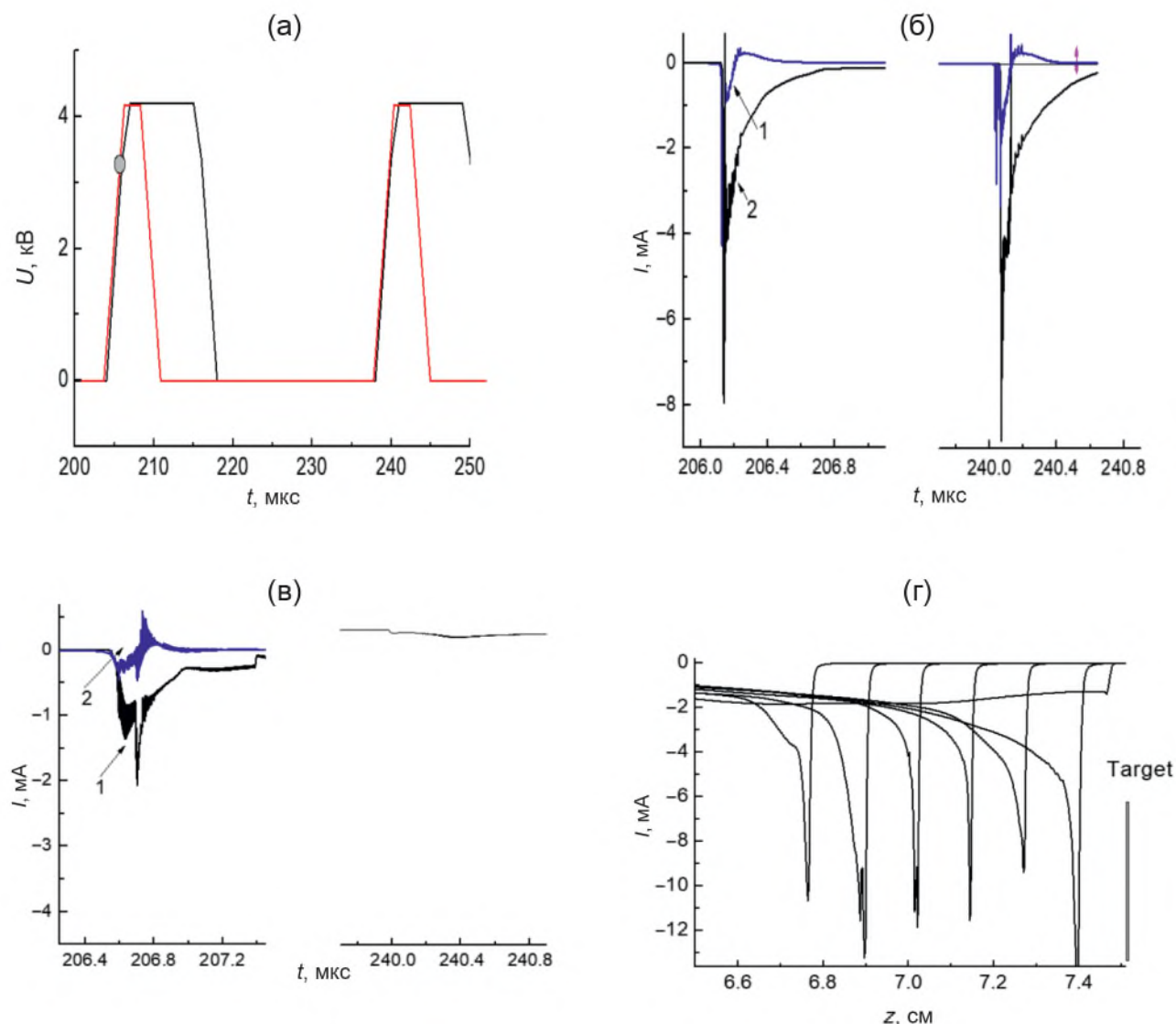


Рис. 4. Численный расчет: напряжение на нагруженном электроде (а), ток вблизи поверхности диэлектрика для $\tau = 7$ (б) и 14 мкс (в) со временем, ХПС с импульсным напряжением, $U = 4 \text{ кВ}$, $f_U = 30 \text{ кГц}$, ток проводимости 1 и ток смещения 2 и профили тока при приближении стримера к диэлектрической пластине, расположенной при $z = 7.51 \text{ см}$ со временем (г).

Ранее, используя полный транскриптомный анализ клеток, обработанных ХПС, мы показали, что ХПС индуцирует повышение экспрессии генов, связанных с апоптозом [35]. Большинство генов со сниженной транскрипционной активностью были связаны с процессами деления клеток. Анализ клеточного цикла, при обработке ХПС, выявил торможение клеточного цикла в фазе G2/М. Таким образом, воздействие ХПС ингибирует пролиферацию клеток и активирует процессы клеточной гибели. Из трех клеточных линий, клетки BgCh4e-134 минимально восприимчивы ко всем типам комбинированной обработки N1–N7. Клетки uMel1 были наиболее чувствительны к обработке РР-ХПС с НЧ. После воздействия жизнеспособность клеток uMel1 падает до 36% для РР7-ХПС и до 48% для РР14-ХПС. Как и ожидалось из анализа тока разряда в разделе 3, импульсный режим

с длительностью импульсов $\tau = 7 \text{ мкс}$ является более эффективным по сравнению с режимом с $\tau = 14 \text{ мкс}$. Анализ жизнеспособности A549 также показал, что НЧ усиливают цитотоксическую активность ХПС в обоих импульсных режимах, но слабо влияют на результаты для синусоидального режима.

При сравнении клеточных линий, культивируемых в разных средах, возникает вопрос о различных антиоксидантных свойствах этих сред и влиянии типа сыроворотки на концентрацию активных компонент. Даже в отсутствие клеток обработка ХПС приводит к образованию различных нитритных радикалов в питательной среде и в среде с сывороткой (FBS) (рис. 6а), что может повлиять на жизнеспособность клеток. Поэтому в наших экспериментах все клеточные линии культивировали с добавлением FBS. Сравнение количества нитритных радикалов в ХПС, обработанной пол-

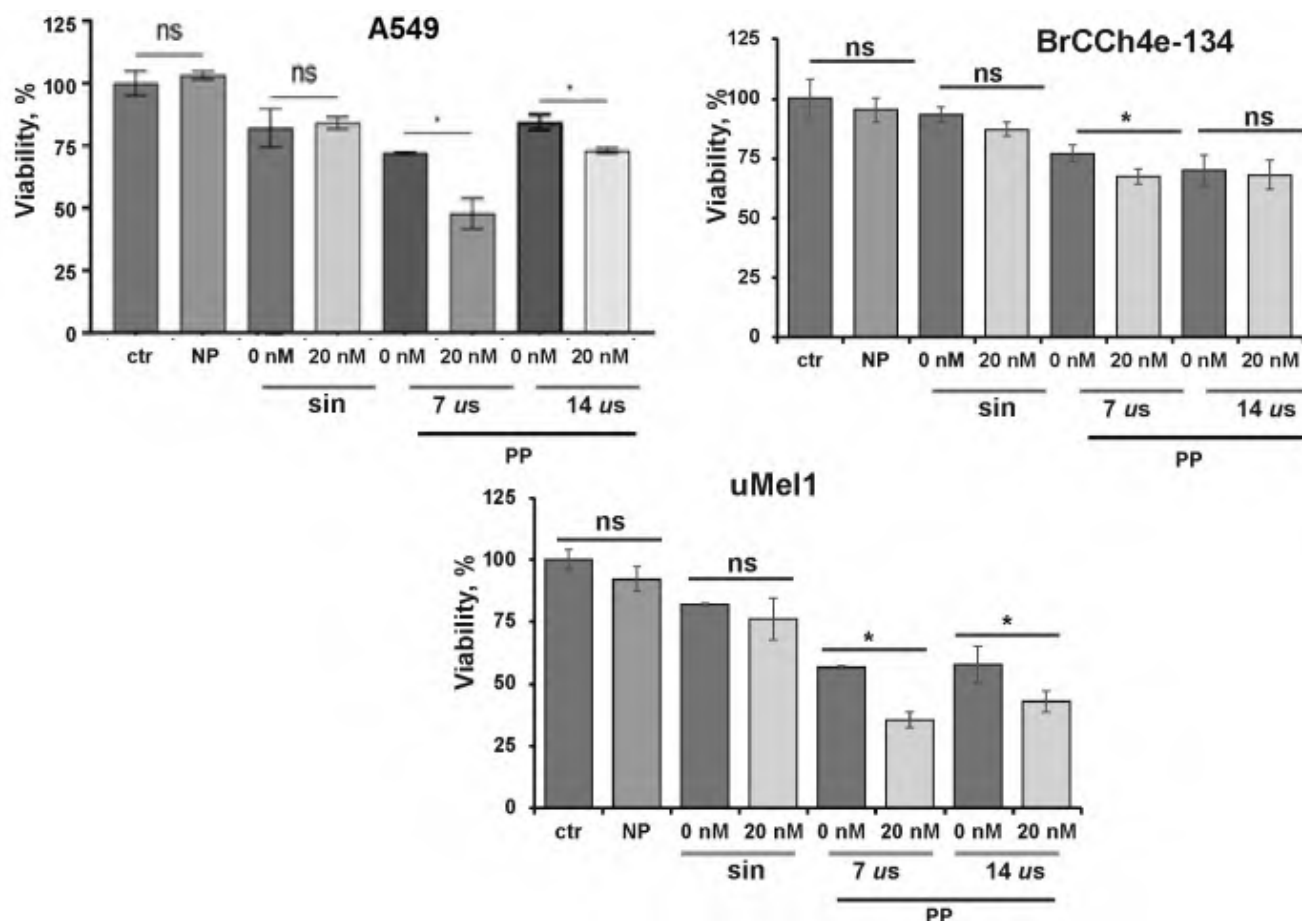


Рис. 5. Жизнеспособность клеток A549, BrCCh4e и uMel1 после совместной обработки ХПС и наночастиц, NP-PEG (20 нМ). NP-PEG добавляли к за 1 ч до обработки ХПС (1 мин). Расстояние от слоя клеток до сопла плазменного источника составляло 25 мм, слой жидкости над клетками — 3 мм. МТТ-анализ жизнеспособности клеток проводили через 24 ч. В качестве положительного контроля использовали клетки, не подвергавшиеся обработке (ctr). Данные представлены как среднее значение жизнеспособности \pm SD. Выполнено три повтора. Статистические различия обозначены как * для $p < 0.05$, ns — несущественные ($p > 0.05$).

ной среде DMEM/F-12 (выращивание клеток A549) и IMDM (выращивание клеток BrCCh4e-134) показало, что существенной разницы в содержании нитрит-ионов не было (рис. 6б). Таким образом, мы считаем, что в наших экспериментах различия между чувствительностью клеточных линий к ХПС обусловлены состоянием антиоксидантной и других жизненно важных систем в клеточных линиях а не различиями в используемых культуральных средах.

5. ПРОНИКНОВЕНИЕ НЧ В КЛЕТКИ

Для изучения стимулирующего воздействия ХПС на проникновение наночастиц в клетки, НЧ-PEG были конъюгированы с флуоресцентной меткой FAM (NP-PEG-FAM) для визуализации поглощения НЧ клетками. Клетки A549 культивировали в стандартных условиях, а затем, за час до обработки ХПС, NP-PEG-FAM добавляли к растущим клеткам. Обработку проводили с помощью sin-ХПС ($U = 2.9$ кВ, $f_U = 50$ кГц, $f_I = 50/4$ кГц, гелий, $v = 9$ л/мин,

время обработки — 1 мин). Интенсивность флуоресценции FAM клеток измеряли с помощью проточной цитометрии через 90 мин и 3 ч. Рис. 7 демонстрирует изменения интенсивности флуоресценции (область P2) при пассивном поглощении НЧ клетками без ХПС и под воздействием ХПС. Сравнение с контрольным образцом (без наночастиц) показало, что уровень пассивного проникновения НЧ в клетки был низким (2–3%). Увеличение времени инкубации клеток с НЧ с 90 мин до 3 ч не привело к увеличению доли клеток, захвативших НЧ. Когда клетки обрабатывали ХПС, количество НЧ-позитивных клеток увеличилось в среднем на 10% по сравнению с пассивным поглощением. Таким образом, прямая обработка ХПС стимулирует проникновение NP-PEG-FAM в клетки.

Поскольку увеличение времени инкубации с НЧ после облучения с 90 мин до 3 ч не привело к увеличению проникновения НЧ в клетки, мы предположили, что облучение ХПС временно изменяет свой-

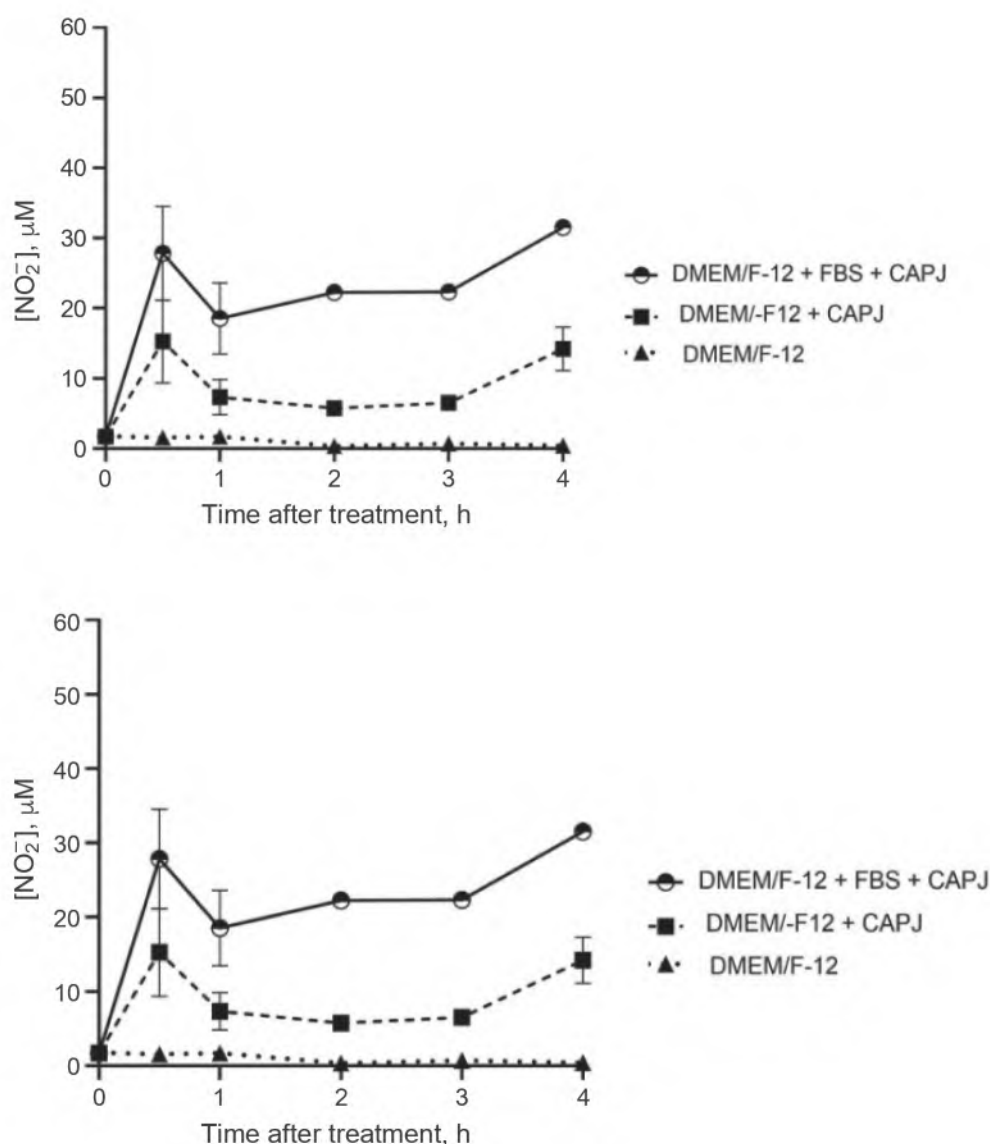


Рис. 6. Влияние прямой обработки CAP на содержание нитрит-ионов в культуральных средах. Культуральные среды обрабатывали sin-ХПС ($U = 2.9$ кВ, $f_U = 50$ кГц, $f_I = 50/4$ кГц, гелий 9 л/мин, 1 мин): сравнение сред DMEM/F-12 и DMEM/F-12 с сывороткой (FBS) (а); сравнение полной культуральной среды DMEM/F-12 и IMDM (б). Полная среда содержит FBS и все остальные добавки для выращивания клеток. Данные представлены как среднее значение четырех технических повторов \pm SD. Статистические различия обозначены как * для $p < 0.05$, ns — несущественные ($p > 0.05$).

ства проницаемости мембраны. Чтобы выяснить временной диапазон проницаемости клеточной мембраны для поглощения НЧ, мы добавляли наноразмерные комплексы NP-PEG-FAM в клетки через различные промежутки времени (0–4 ч) после обработки ХПС. Далее мы сосредоточились на клетках опухоли легкого потому что мы уже показали молекулярные особенности клеточной клеточной смерти под действием ХПС на эти клеточные линии [27, 35], и данное исследование является логическим продолжением предыдущего. Использование клеточных линий A549 и H23 позволит нам в дальнейшем сравнить изменяется ли молекулярный механизм клеточной гибели при добавлении НЧ. Клетки A549 и H23

подвергались воздействию ХПС с синусоидальным и импульсным напряжениями. Анализ проникновения НЧ в клетки проводили через после добавления НЧ в клетки. Результаты анализа показали, что динамика проникновения НЧ была различной для случаев sin-ХПС и PP7-ХПС для обеих клеточных линий (рис. 8). Максимальное проникновение НЧ в ХПС-обработанных клеток было обнаружено при импульсном напряжении с длительностью импульсов 7 мкс, когда НЧ были добавлены сразу после воздействия ХПС. Когда воздействие проводилось с sin-ХПС, эффективно проникали в клетки наночастицы, добавленные через 30 мин–2 ч после облучения ХПС. Видно, что при обработке ХПС, наночастицы легче про-

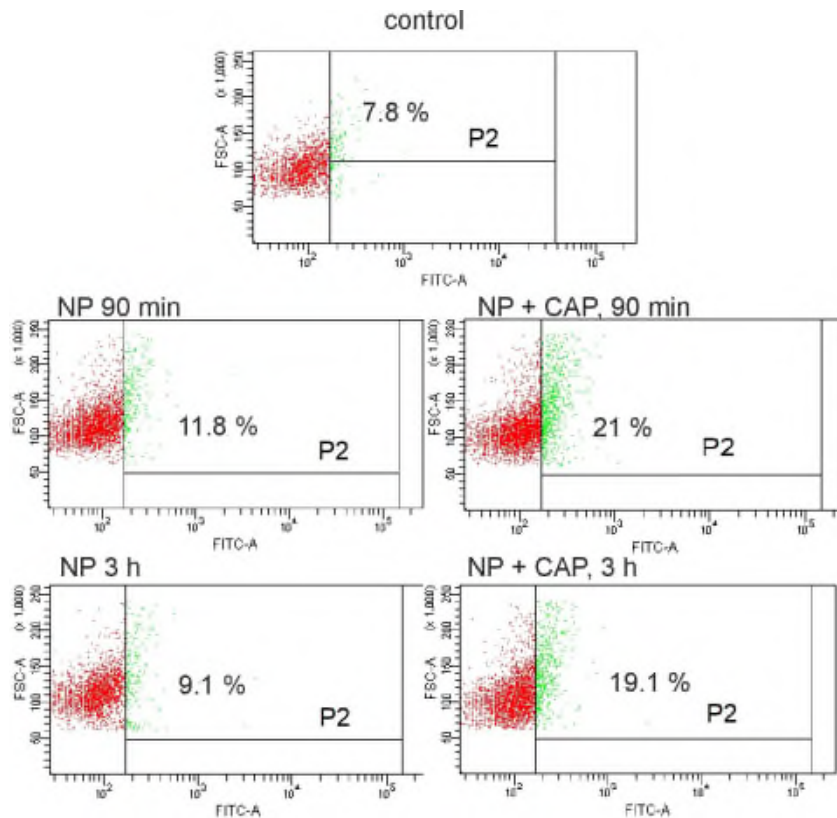


Рис. 7. Интенсивность флуоресценции клеток A549, полученная с помощью проточной цитометрии: контроль — без НЧ и ХПС, пассивное поглощение наночастиц (NP), поглощение наночастиц под воздействием ХПС (NP+CAP). Концентрация наноконплексов (NP-PEG-FAM) 20 нМ, sin-ХПС, $U = 2.9$ кВ, $f_U = 50$ кГц, гелий 9 л/мин, 1 мин обработки. Наноконплексы добавляли за 1 ч до обработки ХПС. Анализ методом проточной цитометрии FAM-позитивных клеток через 90 мин и 3 ч после обработки ХПС. Популяция P2 калибровалась для определения FAM-позитивных клеток (в канале FITC). Выполнено два повтора.

никали в клетки раковые клетки A549, чем в здоровые клетки H23.

Жизнеспособность клеток, обработанных ХПС, показана на рис. 8г для разного времени добавления НЧ. Для совместной обработки ХПС с НЧ применялся режим PP7. Сравнение эффективности проникновения при различных режимах добавления НЧ (рис. 8а) и их влияния на жизнеспособность клеток, обработанных ХПС (рис. 8г), показывает прямую зависимость между эффективностью проникновения НЧ в клетки и увеличением цитотоксического эффекта. Максимальный цитотоксический эффект при комбинированной обработке PP7-ХПС и НЧ достигается при добавлении НЧ за 1 ч до или сразу после воздействия плазменной струей.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Холодная плазменная струя при атмосферном давлении и золотые наночастицы были использованы для подавления жизнеспособности раковых клеток различного типа. С целью получения максимального эффекта воздействия были исследованы режимы генерации плазменной струи генерируемые синусои-

дальным и импульсным напряжениями с различными амплитудами и частотами. На основе измеренных и рассчитанных токов у поверхности воздействия и температуры в зоне контакта было показано, что ХПС, генерируемая импульсным положительным напряжением наиболее эффективна для уничтожения раковых клеток. Варьирование амплитуды и частоты напряжения, $U = 3.8\text{--}4.2$ кВ, $f_U = 20\text{--}30$ кГц, а также длительности импульсов в диапазоне от 5 до 16 мкс дает возможность выбрать оптимальные режимы воздействия. Данные режимы с регулярным распространением стримеров позволяют генерировать большие электрические поля и повышенную концентрации химически активных частиц, а также поддерживать температуру $T < 42^\circ\text{C}$ в зоне воздействия.

Для комбинированного воздействия ХПС и НЧЗ был проведен синтез наночастиц золота различных размеров и исследованы их физико-химические характеристики. Наночастицы конъюгировали с полиэтиленгликолем и присоединили флуорисцентные метки для визуализации проникновения наночастиц в клетки.

В биоэкспериментах цитотоксический эффект воздействия ХПС в комбинации с НЧ золота измеря-

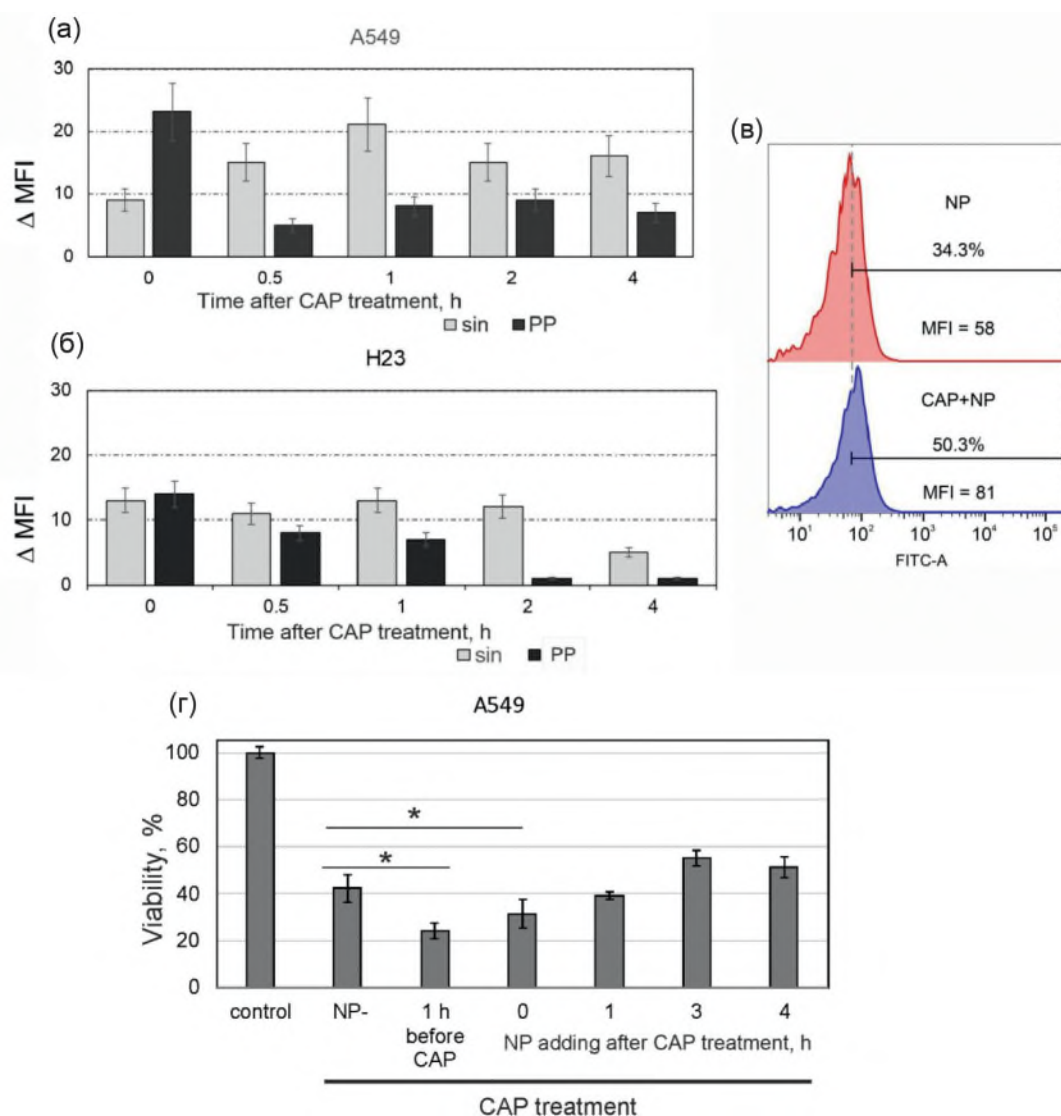


Рис. 8. Динамика накопления НЧ в клетках, стимулированного ХПС. Клетки A549 (а) и H23 (б) обрабатывали ХПС-sin и PP-7 ХПС в течение 1 мин. NP-PEG-FAM (20 нМ) добавляли к клеткам сразу (0 ч) или через 0.5–4 ч после обработки ХПС. Проточная цитометрия. Анализ клеток проводили через час. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, обработанные NPs и не подвергавшиеся воздействию ХПС. Данные представлены как MFI (средняя интенсивность флуоресценции) в канале FAM между накоплением НЧ, обработанных ХПС, и пассивным попаданием НЧ. Два повтора. Пример анализа проточной цитометрии для клеток A549, обработанных NP-PEG-FAM (NP) и NP сразу после обработки PP ХПС (ХПС + NP) (в). Указаны значения MFI и FITC-позитивных популяций (%). Изменения в жизнеспособности клеток A549, подвергшихся воздействию ХПС, при различном времени добавления NP (г). Клетки A549 обрабатывали PP ХПС в течение 1 мин. NP-PEG-FAM (20 нМ) добавляли к клеткам до, сразу (0 ч) или через 1–4 ч после обработки ХПС. Клетки, обработанные НЧ без воздействия ХПС (NP-), использовали в качестве отрицательного контроля. Через 24 ч проводили МТТ-анализ жизнеспособности клеток. Клетки, не подвергавшиеся обработке, использовали в качестве положительного контроля (жизнеспособность 100%). Было выполнено три повтора. Данные представлены как среднее значение жизнеспособности \pm SD. Статистические различия обозначены * при $p < 0.05$.

ли для трех линий раковых клеток: аденокарциномы легкого A549, аденокарциномы молочной железы BrCCh4e-134 и увеальной меланомы uMel1. Обработка клеток проводилась с использованием гелиевой ХПС, генерируемой импульсным напряжением в оптимальном (с длительностью импульсов напряжения 7 мкс) и неоптимальном (14 мкс) режимах, а также с использованием синусоидального оптимального ре-

жима. Как и предсказывали физические исследования, максимальный цитотоксический эффект наблюдался для случая импульсной ХПС с длительностью импульсов 7 мкс.

Добавление наноконплексов НЧ+PEG в среду с клетками с последующим воздействием ХПС показало, что поглощение НЧ клетками увеличивается с помощью ХПС на 13% по сравнению с пассивным

поглощением НЧ (2–3%). Величина цитотоксического эффекта воздействия ХПС коррелировала с режимом максимального проникновения НЧ, а время активного поглощения наночастиц клетками после воздействия ХПС было ограничено. Клетки BrCC4e-134 оказались более резистивными к комбинированной обработке ХПС+НЧ, тогда как клетки uMel1 и A549 оказали высокую чувствительность к такому воздействию.

Отметим, что наночастицы могут быть использованы как носители антираковых препаратов на следующих этапах исследования. Найденные максимально эффективные режимы работы ХПС являются безопасными по температуре и току, что позволяет применить ХПС для обработки животных с опухолями.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда РФФ № 22–49–08003 (<https://rscf.ru/project/22-49-08003/>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Živani M., Espona-Noguera A., Lin A., Canal C. // *Adv. Sci.* 2023. V.10(8). P. 2205803. Doi: 10.1002/advs.202205803.
2. Limanowski R., Yan D., Li L., Keidar M. // *Cancers* 2022. V.14(14). P. 3461. Doi: 10.3390/cancers14143461.
3. Canady J., Murphy R., Zhuang T., Gitelis S., Nissan A., Ly L., Jones O., Cheng X., Adileh M., Blank A. et al. // *Cancers*. 2023. V. 15(14). P. 3688. Doi: 10.3390/cancers15143688.
4. von Woedtke T., Schmidt A., Bekeschus S., Wende K., Weltmann K.-D. // *In Vivo*. 2019. V. 33(4). P. 1011. Doi: 10.21873/invivo.11570.
5. Keidar M., Walk R., Shashurin A., Srinivasan P., Sandler A., Dasgupta S., Ravi R., Guerrero-Preston R., Trink B. // *Brit. J. Cancer*. 2011. V. 105(9). P. 1295. Doi: 10.1038/bjc.2011.386.
6. Keidar M., Shashurin A., Volotskova O., Stepp M., Srinivasan P., Sandler A., Trink B. // *Phys. Plasmas*. 2013. V. 20(5). P. 057101. Doi: 10.1063/1.4801516
7. Kim G., Kim G., Park R., Jeon S., Seo H., Iza F., Lee J. // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2009. V. 42(3). P. 032005. Doi: 10.1088/0022-3727/42/3/032005.
8. Kim G., Park S., Kim G., Lee J. // *Plasma Med.* 2011. V. 1(1). P. 45. Doi: 10.1615/PlasmaMed.v1.i1.40.
9. Cheng X., Murphy W., Recek N., Yan D., Cvelbar U., Vesel A., Mozetic M., Canady J., Keidar M., Sherman J. // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2014. V. 47(33). P. 335402. Doi: 10.1088/0022-3727/47/33/335402.
10. Choi B., Kim M., Song K., Kim U., Hong J., Lee J., Kim G. // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2015. V. 11(5). P. 900. Doi: 10.1166/jbn.2015.1999.
11. Irani S., Shahmirani Z., Atyabi S., Mirpoor S. // *Arch. Med. Sci.* 2015. V. 11(6). P. 1286. Doi: 10.5114/aoms.2015.48221.
12. Choi B., Choi J., Hong J., Song K., Lee H., Kim U., Kim G. // *Int. J. Med. Sci.* 2017. V. 14(11). P. 1101. Doi: 10.7150/ijms.20104.
13. Kim W., Na K.-Y., Lee K.-H., Lee H., Lee J., Kim K.-T. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 10971. Doi: 10.1038/s41598-017-11292-z.
14. Jawaid P., Rehman M., Zhao Q.-L., Misawa M., Ishikawa K., Hori M., Shimizu T., Saitoh J.-I., Noguchi K., Kondo T. // *Cell Death Discov.* 2020. V. 6. P. 83. Doi: 10.1038/s41420-020-00314-x.
15. Kaushik N., Kaushik K., Yoo K., Uddin N., Kim J., Lee S., Choi E. // *Biomaterials*. 2016. V.87. P. 118. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.02.014.
16. Schweigert I., Zakrevsky D., Gugin P., Milakhina E., Biryukov M., Keidar M., Koval O. // *Plasma Sources Sci. Technol.* 2022. V.31(11). P. 114004. Doi: 10.1088/1361-6595/aca120.
17. Schweigert I., Zakrevsky D., Milakhina E., Gugin P., Biryukov M., Patrakova E., Troitskaya O., Koval O. // *Plasma Phys. Rep.* 2023. V. 49(5). P. 595. Doi: 10.1134/S1063780X2360010X.
18. Schweigert I., Zakrevsky D., Milakhina E., Aleksandrov A., Biryukov M., Koval O. // *Plasma Phys. Rep.* 2023. V. 49(11). P. 1358. Doi: 10.1134/S1063780X2360130X.
19. Schweigert I., Zakrevsky D., Gugin P., Yelak E., Golubitskaya E., Troitskaya O., Koval O. // *Appl. Sci.* 2019. V. 9. P. 4528. Doi: 10.3390/app9214528.
20. Schweigert I., Alexandrov A., Zakrevsky D. // *Plasma Sources Sci. Technol.* 2020. V. 29(12). P. 12LT02. Doi: 10.1088/1361-6595/abc93f.
21. Schweigert I., Zakrevsky D., Milakhina E., Gugin P., Biryukov M., Patrakova E., Koval O. // *Plasma Phys. Control. Fusion*. 2022. V. 64(4). P. 044015. Doi: 10.1088/1361-6587/ac53fl.
22. Schweigert I., Vagapov S., Lin L., Keidar M. // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2019. V. 52(29). P. 295201. Doi: 10.1088/1361-6463/ab1319.
23. Jana N., Gearheart L., Murphy C. // *Langmuir*. 2001. V. 17(22). P. 6782. Doi: 10.1021/la0104323.
24. Murphy D., Eritja R., Redmond G. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32(7). P. e65. Doi: 10.1093/nar/gnh065.
25. Liu X., Atwater M., Wang J., Huo Q. // *Colloids Surf. B*. 2007. V. 58(1). P. 3. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.08.005.
26. Koval O., Subrakova V., Nushtaeva A., Belovezhets T., Troitskaya O. // *Genes Cells*. 2019. V. 14(4). P. 66. Doi: 10.23868/201912034.
27. Patrakova E., Biryukov M., Troitskaya O., Gugin P., Milakhina E., Semenov D., Poletaeva J., Zakrevsky D., Schweigert I., Koval O. et al. // *Cells*. 2023. V. 12(2). P. 290.

- Doi: 10.3390/cells12020290.
28. Koval O., Kochneva G., Tkachenko A., Troitskaya O., Sivolobova G., Grazhdantseva A., Nushtaeva A., Kuligina E., Richter V. // *Biomed. Res. Int.* 2017. V. 2017. P. 3620510.
Doi: 10.1155/2017/3620510.
 29. Busco G., Robert E., Chettouh-Hammas N., Pouvesle J.-M., Grillon C. // *Free Radic. Biol. Med.* 2020. V. 161. P. 290.
Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.004.
 30. Kaneko T., Sasaki S., Hokari Y., Horiuchi S., Honda R., Kanzaki M. // *Biointerphases*. 2015. V. 10. P. 029521.
Doi: 10.1116/1.4921278.
 31. Shaw P., Kumar N., Hammerschmid D., Privat-Maldonado A., Dewilde S., Bogaerts A. // *Cancers*. 2019. V. 11(8). P. 1109.
Doi: 10.3390/cancers11081109.
 32. Yan D., Xu W., Yao X., Lin L., Sherman J., Keidar M. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 15418.
Doi: 10.1038/s41598-018-33914-w.
 33. Kim K., Lee W. G. // *J. Mater. Chem. B.* 2017. V. 5. P. 2726.
Doi: 10.1039/C7TB00038C.
 34. Гугин П. П., Закревский Д. Э., Милахина Е. В. // *Письма ЖТФ*. 2021. Т. 48 (22). С. 41.
doi: 10.21883/PJTF.2021.22.51726.18977.
 35. Biryukov M., Semenov D., Kryachkova N., Polyakova A., Patrakova E., Troitskaya O., Milakhina E., Zakrevsky D., Schweigert I., Koval O. et al. // *Biomolecules*. 2023. V. 13(11). P. 1672.
Doi: 10.3390/biom13111672.

ENHANCEMENT OF THE ANTICANCER EFFECT DURING THE SIMULTANEOUS TREATMENT OF CELLS BY A COLD ATMOSPHERIC PLASMA JET AND GOLD NANOPARTICLES

I. Schweigert^{a,*}, D. Zakrevsky^{a,b,c}, E. Milakhina^{a,b,c}, P. Gugin^{a,b}, M. Biryukov^{a,d}, A. Polyakova^{a,d}, N. Kryachkova^{a,d}, E. Gorbunova^{a,d}, A. Epanchintseva^d, I. Pyshnaya^d, and O. Koval^{a,d}

^aKhristianovich Institute of Theoretical and Applied Mechanics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

^bRzhanov Institute of Semiconductor Physics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

^cNovosibirsk State Technical University, Novosibirsk, 630073 Russia

^dInstitute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: ivschweigert@gmail.com

Selecting the most effective and biologically safe operation regimes of a cold atmospheric plasma jet (CAPJ) is a defining factor in developing the cancer treatments based on the CAPJ. Experimentally and numerically, by changing the pulse duration of the positive pulsed voltage, we determined the optimum CAPJ regimes with regular propagation of streamers and a maximum discharge current at a temperature $T < 42^\circ\text{C}$. In these regimes, the CAPJ appreciably suppresses the viability of the cancerous cells. It was shown that adding gold nanoparticles increases the cytotoxic effect of the plasma jet and decreases the viability of the NCI-H23 epithelioid lung adenocarcinoma, the A549 lung adenocarcinoma, the BrCC4e-134 mammary adenocarcinoma, and the cells of the uMel1 uveal melanoma. The polyethyleneglycol-modified gold nanoparticles with fluorescent labels were used to visualize the absorption of the nanoparticles by the cells. It was shown that the CAPJ stimulated the penetration of the nanoparticles into the cells when they were applied to the medium immediately before the CAPJ treatment or immediately after, which indicates a short-time increase in the permeability of the cell membrane.

Keywords: cold atmospheric plasma jet, penetration of gold nanoparticles, pulsed voltage, pulse duration, regime optimization