

*На правах рукописи*

АРХИПОВА ЕВГЕНИЯ ВЛАДИМИРОВНА

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ  
МОНОНУКЛЕАРНЫХ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ  
ВОЗДЕЙСТВИЯ ИЗЛУЧЕНИЕМ ПЛАЗМЫ ИСКРОВОГО РАЗРЯДА И  
УФ-ИЗЛУЧЕНИЕМ**

1.5.5 – физиология человека и животных

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2022

Работа выполнена в Центральной научно-исследовательской лаборатории федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный  
руководитель:**

**Иванова Ирина Павловна,**  
доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры молекулярной биологии и иммунологии Института биологии и биомедицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского»

**Официальные  
оппоненты:**

**Москвин Сергей Владимирович,**  
доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры реабилитационной и спортивной медицины Академии постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»

**Орлова Анна Геннадьевна,**  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории биофотоники Отдела радиофизических методов в медицине Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики Российской академии наук»

**Ведущая  
организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет»

Защита состоится: «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ года в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.2.340.06 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/files/2022/1229/diss-Arkipova-1229.pdf>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Акинчиц Елена Константиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы.**

Структурно-функциональное состояние клеток иммунной системы определяет интенсивность иммунного ответа и в целом гомеостаз организма (Романюха, 2009; Lee et al., 2013; Phan et al., 2017; Piasecka et al., 2020). Функциональная и метаболическая активность перитонеальных клеток во многом зависит от целостности мембраны, а также от расположения, структурного состояния и взаимодействия мембранных компартментов, которые обуславливают возможности рецепторного аппарата и полноценное функционирование клеток (Пинегин, Краснова, 2009; Лямина, Малышев, 2014; Артюхов и др., 2016; Köberlin et al., 2016). Гиперактивация или снижение активности клеток иммунной системы может приводить к изменению резистентности организма. В связи с этим поиск и исследование различных химических и физических факторов способных либо увеличивать, либо снижать активность клеток иммунной системы является актуальным.

Одним из таких физико-химических факторов является излучение холодной газоразрядной плазмы или плазмы искрового разряда, биологическое действие которой активно исследуется в последнее десятилетие (Keidar et al., 2011; Иванова и др., 2014; Пискарев и др., 2016; Flynn et al., 2016; Chen et al., 2017; Kubinova et al., 2017; Friedman, 2020). Известно цитотоксическое и бактерицидное (Иванова, Заславская, 2009; Hammer et al., 2013; Lu et al., 2016; Астафьева, Иванова, 2017; Laroussi, 2017; Hirano et al., 2019; Nicol et al., 2020), ранозаживляющее и противовоспалительное действие (Martines et al., 2009; Lu et al., 2016; Laroussi, 2017; Kubinova et al., 2017) холодной плазмы. Показано увеличение продолжительности жизни животных с неопластическими процессами и изменение фагоцитарной активности после воздействия излучением плазмы (Иванова, 2006).

Одним из действующих факторов излучения плазмы искрового разряда является УФ-излучение (Иванова, 2006; Пискарев и др., 2014). В процессе генерации излучения плазмы и УФ-излучения, образуются активные частицы и радикальные продукты, участвующие в реакциях окисления и восстановления и способные разнонаправлено влиять на модификацию макромолекул: липидов, белков, нуклеиновых кислот, участвовать в регуляции клеточных функций, сигнальных путей, выступать в качестве вторичных мессенджеров, индуцировать как клеточную пролиферацию, так и гибель клеток (Thannickal, Fanburg, 2000; Friedman et al., 2008; Kong et al., 2009; Leduc et al., 2010; Иванова и др., 2012; Пискарев и др., 2013; Артюхов и др., 2016; Реутов, 2016; Башарина и др., 2018; Hirano et al., 2019; Nicol et al., 2020; Артюхов, Башарина, 2021).

Несмотря на то, что устройства, генерирующие плазму, активно применяются в медицине и здравоохранении, к настоящему времени не проводились комплексные исследования по изучению влияния излучения плазмы искрового разряда и УФ-излучения на структурное состояние мембран и функциональную активность мононуклеарных клеток перитонеальной полости.

### **Цель и задачи исследования**

Цель работы – изучить структурно-функциональное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы искрового разряда.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Изучить характеристики мембран мононуклеарных перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы в сравнении с УФ-излучением при кратковременных и длительных режимах в эксперименте *in vitro*.
2. Оценить функциональную активность мононуклеарных перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы в сравнении с УФ-излучением при кратковременных и длительных режимах в эксперименте *in vitro*.
3. Исследовать в эксперименте *in vivo* влияние излучения плазмы на функциональное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток.

### **Научная новизна**

Проведена комплексная оценка влияния излучения плазмы на структурное состояние мембран и функциональную активность мононуклеарных перитонеальных клеток.

Показано, что кратковременные режимы воздействия излучением плазмы оказывают стимулирующее действие на функциональную активность перитонеальных клеток, а длительные режимы снижают способность к активации.

Установлено, что основными процессами в механизмах снижения функциональной активности после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением на мононуклеарные перитонеальные клетки являются изменения фосфолипидного спектра, увеличение микровязкости, десИАлирование клеточной поверхности и модификация белков.

Выявлено, что излучение плазмы и УФ-излучение разнонаправленно действуют на состояние жирнокислотного слоя фосфолипидов: излучение плазмы искрового разряда – разрыхляет, а УФ-излучение уплотняет его. Излучение плазмы интенсивнее окисляет ароматические аминокислоты: тирозин и триптофан, а УФ-излучение способствует образованию сшивок между углеводами и белками.

Впервые установлено, что излучение плазмы в отличие от УФ-излучения активизирует потенциальную способность перитонеальных клеток отвечать на стимуляцию. Излучение плазмы искрового разряда уменьшает время наступления «кислородного взрыва», а УФ-излучение увеличивает.

Впервые в эксперименте *in vivo* показано стимулирующее действие на функциональную активность мононуклеарных перитонеальных клеток излучения плазмы, что выражается в усилении адгезивных свойств, активации процессов фагоцитоза и кислородзависимого метаболизма.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные результаты исследований вносят существенный вклад в понимание биологических эффектов излучения плазмы искрового разряда, расширяют современные представления о характере изменений структурно-функционального состояния моноклеарных перитонеальных клеток и позволяют дать рекомендации по разработке подходов и методов и их применению в биологических исследованиях.

Результаты исследования могут быть положены в основу разработки экспериментальных устройств, генерирующих излучение плазмы и позволяющих регулировать, усиливать или снижать функциональную активность моноклеарных клеток. Такие устройства могут применяться в дальнейших физиолого-биохимических и физико-химических исследованиях. Они могут быть использованы для разработки способов регулирования взаимодействия клеток иммунной системы и организма, что необходимо для коррекции различных патологических состояний.

Данные о механизмах действия излучения плазмы искрового разряда на структурно-функциональное состояние моноклеарных перитонеальных клеток могут быть включены в учебные программы по биологии, физиологии, биохимии для студентов и аспирантов биомедицинских специальностей.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Кратковременные режимы воздействия (60 и 300 с) излучением плазмы искрового разряда *in vitro* вызывают активацию функционального состояния моноклеарных перитонеальных клеток за счет образования клетками активных форм кислорода и активируют потенциальную способность клеток отвечать на стимуляцию.

2. Длительные режимы воздействия (600 и 1200 с) излучением плазмы и УФ-излучением *in vitro* вызывают снижение активности перитонеальных клеток за счет изменения физико-химических свойств клеточных мембран.

3. Излучение плазмы в отличие от УФ-излучения при длительных режимах воздействия интенсивнее окисляет ароматические аминокислоты белков, снижает упорядоченность углеводородного слоя фосфолипидов, уменьшает время наступления «кислородного взрыва».

4. В эксперименте *in vivo* трехкратное излучение плазмы искрового разряда длительностью 120 и 300 с оказывает стимулирующее действие на функциональную активность моноклеарных перитонеальных клеток, увеличивает адгезивные свойства, активирует процессы фагоцитоза и кислородзависимого метаболизма.

### **Апробация работы**

Результаты работы были доложены и обсуждены на Десятой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2007); на международной конференции «Высокоинтенсивные физические факторы в биологии, медицине, сельском хозяйстве и экологии» (Саров, 2008); на международной конференции «Высокоинтенсивные физические факторы в биологии, медицине, сельском

хозяйстве и экологии» (Саров, 2011); на XI международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (Севастополь, 2016); на 69-й Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение и управление» (Н. Новгород, 2016); на III всероссийской научной конференции молодых ученых "Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия" (Санкт-Петербург, 2016); на III Всероссийской 14-й межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем медицины» (Н. Новгород, 2017); на 70-й Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение и управление» (Н. Новгород, 2017); на XXIII съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова (Воронеж, 2017); на 71-й Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение и управление» (Н. Новгород, 2018); на XXXI Международной школе-симпозиуме по голографии, когерентной оптике и фотонике (Екатеринбург, 2019); на VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VolgaMedScience» (Н. Новгород, 2021).

### **Публикации**

По материалам диссертационной работы опубликовано 23 научных работы, из них 5 публикаций в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией для публикации результатов кандидатских диссертаций, и рецензируемых научных изданиях, входящих в международные системы цитирования.

### **Объём и структура диссертации**

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов. Список цитируемой литературы включает 245 источников (110 отечественных и 135 зарубежных). Работа содержит 17 рисунков и 8 таблиц.

### **Материалы и методы исследования**

Все эксперименты были выполнены с использованием аутбредных лабораторных крыс Wistar, самцов массой 180 – 200 грамм, выращенных в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде, а также естественном чередовании суточной освещенности.

В качестве объекта исследования использовали мононуклеарные клетки перитонеальной полости крыс. Эксперименты проведены *in vitro* и *in vivo*. Контролем служили клетки, не подвергавшиеся воздействию. Распределение по сериям, условия эксперимента и численность групп представлены в таблице 1.

Генерация излучения плазмы искрового разряда проводилась импульсным устройством с заданными параметрами: длительность одного импульса – 100 мкс, частота повторения импульсов – 10 Гц, энергия в одном импульсе –  $5,9 \cdot 10^{-2}$  Дж, напряжение источника питания – 11 кВ, мощность –

0,59 Вт. Спектр излучения сплошной, максимум при длине волны 220 нм, по мере остывания искрового шнура максимум спектра излучения смещается в сторону более длинных волн и проходит весь ультрафиолетовый и видимый диапазон до 700 нм. Плотность мощности  $2 \times 10^{-3}$  Вт/см<sup>2</sup>. Electrodes с диаметром 2 мм и длиной 15 мм выполнены из нержавеющей стали, расстояние между электродами – 3 мм. При этом излучение плазмы импульсное и плотность мощности в одном импульсе выше. Устройство «Пилимин» разработано И.М. Пискаревым, ведущим научным сотрудником института ядерной физики им. Д.В. Скобельцина МГУ им М.В. Ломоносова (Пискарев и др., 2014). Источником УФ-излучения служила ртутная лампа низкого давления ДКБ-9 (ОАО «ГЗАС им. А.С. Попова», Россия, 2009). Характер спектра лампы линейчатый с основным максимумом в области  $\lambda = 254$  нм, мощность – 9 Вт, плотность мощности  $2,6 \times 10^{-2}$  Вт/см<sup>2</sup>.

Таблица 1

Основные этапы исследования и распределение по сериям

Этапы исследования	Экспериментальные серии	Группы – время воздействия, с; n – количество проб	n – количество животных	
<i>in vitro</i>	Оценка цитотоксического действия излучения плазмы искрового разряда и УФ-излучения	без воздействия (n=15)	5	
		30 (n=24)		
		60 (n=22)		
		300 (n=35)		
		600 (n=34)		
		1200 (n=34)		
	Изучение структурного состояния клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением	без воздействия (n=65)	10	
		30 (n=78)		
		60 (n=76)		
		300 (n=95)		
		600 (n=85)		
	Изучение функциональной активности клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением	без воздействия (n=55)	8	
		30 (n=52)		
		60 (n=60)		
		300 (n=50)		
		600 (n=53)		
	<i>in vivo</i>	Контроль	без воздействия	12
		Однократное воздействие излучением плазмы	60	7
120			7	
300			5	
600			5	
Трехкратное воздействие излучением плазмы		60	7	
		120	7	
		300	5	
		600	5	
Отмена после трехкратного воздействия излучением плазмы		60	6	
		120	6	
		300	5	
		600	5	
Общее количество животных			105	

Основные методы исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

Общая схема экспериментов и методы исследования

Этапы исследования	Методы исследования
Оценка цитотоксического действия	1. Подсчет общего количества клеток (Клиническая..., 1999) 2. Определение жизнеспособности клеток (Митрошина и др., 2015) 3. Интерференционная микроскопия (Загубиженко, 2011)
Изучение структурного состояния клеток	1. Анализ процентного содержания липидов и фосфолипидов (тонкослойная хроматография) (Творогова и др., 1998; Шаршунова и др., 1980; Кейте, 1975; Folch et al., 1957) 2. Анализ молекулярных продуктов окисления липидов: диеновые конъюгаты, триеновые конъюгаты, ТБК-активные продукты, основания Шиффа (Арутюнян и др., 2000; Fletcher et al., 1973; Folch et al., 1957; Shenstone, 1971; Smith et al., 1976) 3. Окислительная модификация белков: флуоресценция остатков тирозина, триптофана и гликозилированных белков, определение карбонильных производных (Дубинина, 1995; Пискарев и др., 2016; Davies, 1987; Munch et al., 1997) 4. Активность супероксиддисмутазы (Клинико-диагностическое..., 2004; Nishikimi et al., 1972) 5. Измерение микровязкости мембран (флуоресценция пирена) (Самойлова, 2006) 6. Оценка молекулярной организации углеводородного слоя мембран (флуоресценция 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена) (Молотковский, 1999; Canto, 2016; Ranall, 2011) 7. Оценка концентрации сиаловых кислот (набор реагентов СИАЛОТЕСТ 100, НПЦ «ЭКО-СЕРВИС», Россия)
Изучение функциональной активности клеток	1. Оценка адгезивных свойств (Шаронов, Храмова, Мальцева, 2005) 2. Активность миелопероксидазы (Ягода, 2005) 3. Оценка функциональной активности методом люминолзависимой хемилюминесценции (Владимиров, Проскурина, 2009; Рощупкин и др., 2006; Хабибуллин, Федосов, 2006; Маянский и др., 1996) 4. Оценка фагоцитарной активности (Иммунология..., 2010) 5. Оценка кислородзависимого метаболизма (Маянский, Винсман, 1979)

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Microsoft EXCEL и Statistica 6. Полученные результаты представлены в виде Me (25-й и 75-й процентиль), где Me — медиана регистрируемого параметра по серии экспериментов.

Различия между группами оценивали при помощи непараметрического критерия Крускала-Уоллиса, при выявлении достоверных различий использовали непараметрический критерий Манна-Уитни с поправкой Холма-Бонферрони для нивелирования эффекта множественных сравнений. Для оценки различий между двумя независимыми выборками применяли критерий Манна-Уитни. Считали две выборки принадлежащими к разным генеральным совокупностям при  $p < 0,05$ .

## Результаты исследования и их обсуждение

### 1. Влияние излучения плазмы искрового разряда и УФ-излучения на моноклеарные перитонеальные клетки в эксперименте *in vitro*

#### 1.1. Анализ цитотоксического действия излучения плазмы искрового разряда и УФ-излучения

При исследовании действия различных факторов важно оценить их влияние на отдельные системы и клеточные функции. Степень активации или повреждения клеток в результате воздействия физических факторов в первую очередь зависит от их концентрации. Поэтому на первом этапе эксперимента оценивали цитотоксическое действие излучения плазмы искрового разряда и УФ-излучения. Для этого подсчитывали общее количество клеток, оценивали жизнеспособность и параметры фазовых портретов после воздействия.

Установлено, что кратковременные режимы воздействия излучением плазмы искрового разряда и УФ-излучением не влияют на количество перитонеальных клеток. Снижение количества клеток наблюдается после воздействия излучением плазмы длительностью 600 и 1200 с на 21,0% и 33,0% соответственно по сравнению с контрольной группой (рис. 1). После воздействия УФ-излучением длительностью 300, 600 и 1200 с наблюдается снижение общего количества клеток на 19,0%, 25,0% и 43,0% соответственно.

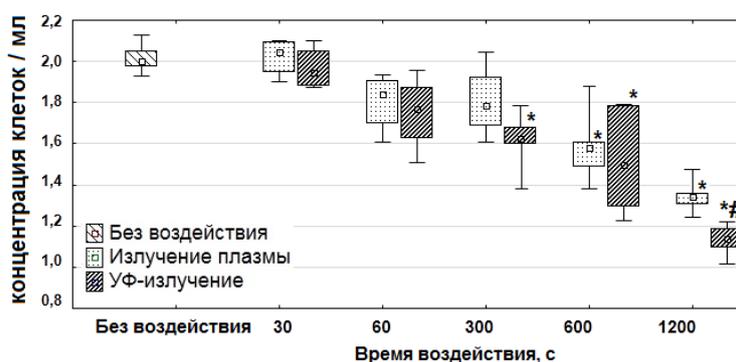


Рис. 1. Общее количество клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде Me  $\pm$  25-й и 75-й процентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: \* — по сравнению с контрольной группой,  $p \leq 0,05$ ; # — по сравнению с излучением плазмы,  $p \leq 0,05$

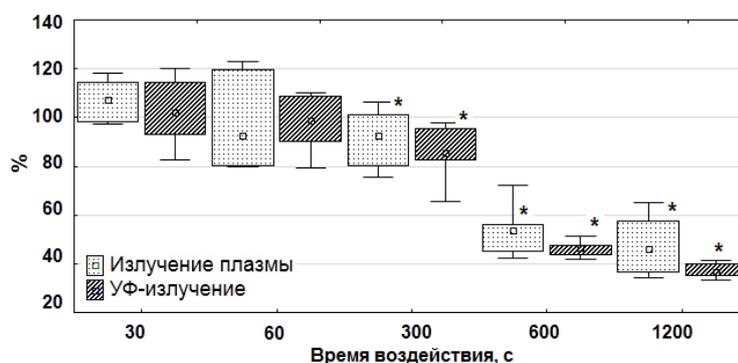


Рис. 2. Жизнеспособность клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде Me  $\pm$  25-й и 75-й процентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: \* — по сравнению с группой 30 с,  $p \leq 0,05$

Не наблюдается снижение жизнеспособности клеток при воздействии излучением плазмы искрового разряда и УФ-излучением длительностью 60 с. Установлено снижение жизнеспособности популяции перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы длительностью 300, 600 и 1200 с на 13,8%, 50,0% и 57,0% соответственно (рис. 2). При воздействии УФ-излучением длительностью 300, 600 и 1200 с также наблюдается снижение жизнеспособности перитонеальных клеток на 20,6%, 56,8% и 65,8% соответственно.

Снижение общего количества и жизнеспособности клеток при длительных режимах воздействия излучением плазмы искрового разряда и УФ-излучением свидетельствует о наличии цитотоксического эффекта. При этом перитонеальные клетки более резистентны к излучению плазмы, так как после УФ-излучения при максимальном времени воздействия общее количество клеток снижается значительно.

Для оценки параметров фазовых портретов мононуклеарных перитонеальных клеток использовали метод интерференционной микроскопии. После воздействия излучением плазмы искрового разряда длительностью 300, 600 и 1200 с наблюдается снижение фазовой высоты клеток на 9,0 – 11,6% (рис. 3). Установлено увеличение максимального диаметра клетки на 14,7% и площади на 61,8% при режиме воздействия длительностью 1200 с. После воздействия УФ-излучением длительностью 300, 600 и 1200 с наблюдается снижение фазовой высоты клеток на 15,8 – 24,1%. При режиме воздействия длительностью 600 и 1200 с установлено увеличение минимального диаметра клетки на 9,8% и 11,3% соответственно. Показано увеличение максимального диаметра клетки на 21,2% при воздействии длительностью 1200 с. Площадь клеток увеличивается при режимах воздействия длительностью 600 и 1200 с более чем в 2 раза.

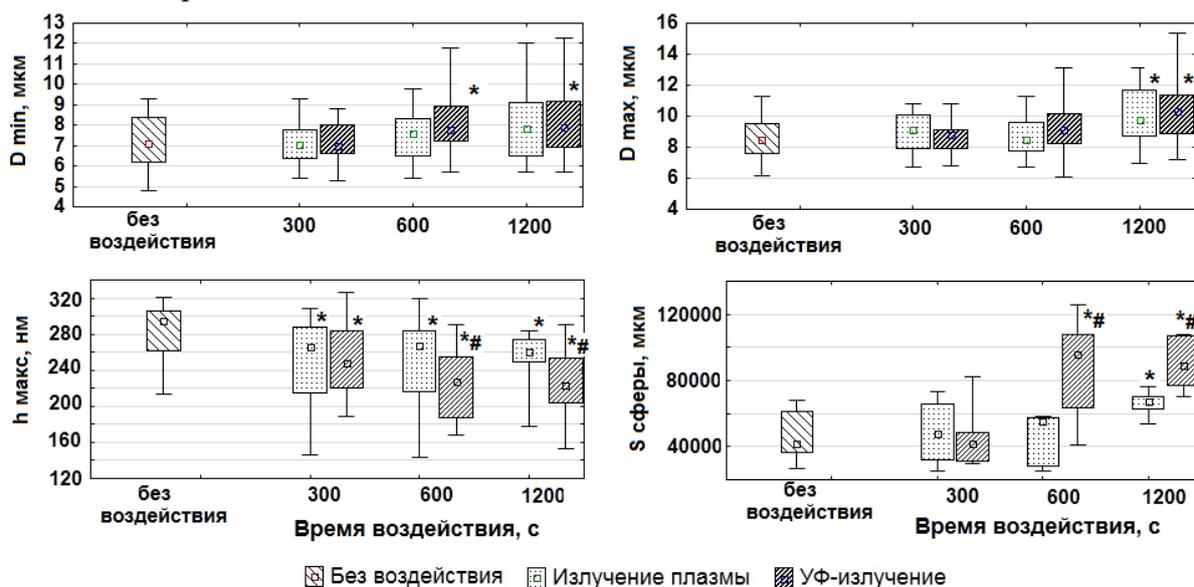


Рис. 3. Параметры фазовых портретов клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: \* — по сравнению с контрольной группой,  $p \leq 0,05$ ; # — по сравнению с излучением плазмы,  $p \leq 0,05$

УФ-излучение после воздействия длительностью 600 и 1200 с интенсивнее снижает фазовую высоту на 15,1% и 14,2% соответственно, а также приводит к увеличению площади на 74,3% и 32,5% соответственно по сравнению с излучением плазмы.

Таким образом, показано, что длительные режимы воздействия излучением плазмы искрового разряда и УФ-излучением, оказывают цитотоксический эффект на перитонеальные клетки.

## 1.2. Влияние излучения плазмы искрового разряда и УФ-излучения на структурное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток

Цитоплазматическая мембрана является первой мишенью для реакционноспособных видов, созданных излучением плазмы и УФ-излучением.

Далее изучали состояние липидного спектра суспензии мононуклеарных перитонеальных клеток. Установлено, что излучение плазмы искрового разряда длительностью 300, 600 и 1200 с приводит к увеличению фракции эфиров холестерина (ЭХС) на 14,9 – 31,4% ( $p < 0,01$ ). При режимах воздействия длительностью 300, 600 и 1200 с выявлено снижение фракции фосфолипидов (ФЛ) на 24,5 – 45,6% ( $p \leq 0,01$ ). Известно, что увеличение в клетках суммарного холестерина (ХС+ЭХС) позволяет обеспечить стабильность клеточным структурам. Увеличение доли ЭХС может быть связано с возможными окислительными реакциями после воздействия излучения. Снижение фракции ФЛ связано со снижением фракции фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина и вероятно связано с модификацией этих фракций ФЛ. Наибольший вклад в изменение липидного спектра вносит режим воздействия длительностью 1200 с наблюдается увеличение соотношения холестерина к суммарному количеству фосфолипидов (ХС/ФЛ) на 68,0% (рис. 4), что указывает на перераспределение основных структурообразующих липидных компонентов.

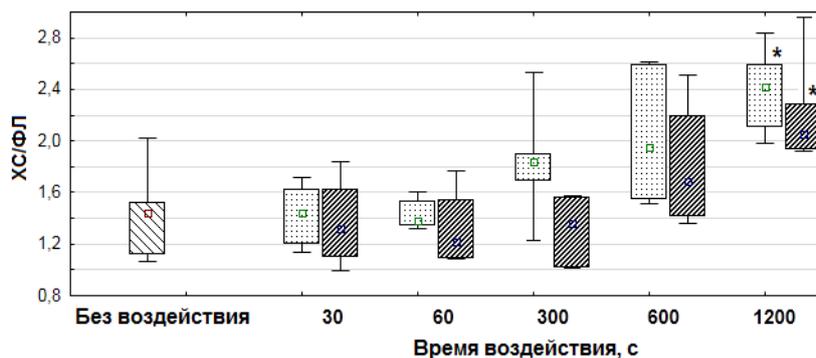


Рис. 4. Соотношение холестерина к суммарному количеству фосфолипидов в клетках после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде Me  $\pm$  25-й и 75-й перцентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: \* — по сравнению с контрольной группой,  $p \leq 0,05$

УФ-излучение также влияет на липидный состав мононуклеарных перитонеальных клеток. Воздействие длительностью 1200 с вызывает возрастание доли ЭХС на 19,3% ( $p = 0,005$ ), снижение фракции ФЛ на 33,7% ( $p = 0,003$ ), наблюдается увеличение ХС/ФЛ на 42,4% (рис. 4).

В целом изменения липидного спектра после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением свидетельствуют об изменениях в клетках, которые характеризуются повышением жесткости клеточных мембран и могут приводить к изменению функциональных возможностей клеток, ограничивая поступление субстратов и нарушая работу рецепторного аппарата.

Одним из параметров оценки наличия окислительного стресса в нарушении структуры мембран является накопление продуктов липопероксидации, однако при выбранных режимах воздействия не установлено активации процессов окисления липидов. Вероятно, изменения отдельных фракций липидов связаны с воздействием активных частиц излучения и модификацией липидов.

Ранним и наиболее чувствительным параметром модификации макромолекул является модификация белков. Флуоресценцию остатков тирозина, триптофана и продуктов неферментативного гликозилирования белков используют для оценки степени модификации белков. Модификация тирозиновых и триптофановых остатков сопровождается снижением флуоресценции, а накопление продуктов гликозилирования белков наоборот сопровождается повышенной флуоресценцией.

Таблица 3.

Флуоресценция триптофана, тирозина и гликозилированных белков после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением

Время воздействия, с	Излучение плазмы			УФ-излучение		
	Триптофан, отн. ед.	Тирозин, отн. ед.	Гликозилированные белки, отн. ед.	Триптофан, отн. ед.	Тирозин, отн. ед.	Гликозилированные белки, отн. ед.
<i>Без воздействия</i>	0,711 (0,664; 0,748)	0,513 (0,469; 0,542)	0,0073 (0,0072; 0,0080)	0,711 (0,664; 0,748)	0,513 (0,469; 0,542)	0,0073 (0,0072; 0,0080)
30	0,625 (0,554; 0,715)	0,435 (0,393; 0,479)	<b>0,0087 (0,0083; 0,0094) *</b> p=0,004	0,688 (0,619; 0,693)	0,482 (0,456; 0,502)	0,0082 (0,0079; 0,0083)
60	<b>0,511 (0,509; 0,553) *</b> p=0,015	<b>0,360 (0,314; 0,380) *</b> p=0,005	<b>0,0090 (0,0087; 0,0093) *</b> p=0,003	0,675 (0,656; 0,685) # p=0,037	0,482 (0,467; 0,496) # p=0,028	<b>0,0093 (0,0090; 0,0094) *</b> p=0,014
300	<b>0,355 (0,334; 0,410) *</b> p=0,003	<b>0,268 (0,236; 0,305) *</b> p=0,003	<b>0,0099 (0,0093; 0,0105) *</b> p=0,002	<b>0,497 (0,485; 0,532) *#</b> p=0,017; 0,014	<b>0,371 (0,301; 0,432) *</b> p=0,017	<b>0,0093 (0,0090; 0,0099) *</b> p=0,025
600	<b>0,206 (0,153; 0,235) *</b> p=0,003	<b>0,135 (0,090; 0,167) *</b> p=0,002	<b>0,0082 (0,0081; 0,0088) *</b> p=0,022	<b>0,374 (0,311; 0,391) *#</b> p=0,010; 0,025	<b>0,264 (0,217; 0,291) *#</b> p=0,010; 0,018	<b>0,0108 (0,0099; 0,0113) *#</b> p=0,012; 0,018
1200	<b>0,121 (0,107; 0,122) *</b> p=0,006	<b>0,086 (0,077; 0,102) *</b> p=0,003	<b>0,0083 (0,0076; 0,0088) *</b> p=0,022	<b>0,239 (0,229; 0,265) *#</b> p=0,011; 0,020	<b>0,192 (0,184; 0,207) *#</b> p=0,011; 0,014	<b>0,0114 (0,0111; 0,0116) *#</b> p=0,008; 0,006

Данные представлены в виде Me (25-й и 75-й процентиль). Статистически значимые различия: \* — по сравнению с контрольной группой; # — по сравнению с излучением плазмы.

Установлено, что режимы воздействия излучением плазмы искрового разряда длительностью 60, 300, 600 и 1200 с приводят к постепенному

снижению флуоресценции триптофана и тирозина на 28,1 – 83,0% и 29,8 – 83,2% соответственно по сравнению с контрольной группой (табл. 3). Наблюдается накопление содержания гликозилированных белков при всех режимах воздействия излучением плазмы искрового разряда на 12,3 – 35,6%, но при этом не установлено зависимости от времени воздействия. УФ-излучение длительностью 300, 600 и 1200 с также способствует постепенному снижению флуоресценции триптофана и тирозина на 30,1 – 66,4% и 27,7 – 62,4% соответственно. Режимы воздействия длительностью 60, 300, 600 и 1200 с приводят к постепенному накоплению продуктов гликозилирования белков на 27,4 – 56,2% (табл. 3).

Таким образом, наблюдается интенсификация модификации белковых молекул клеток после воздействия. Показано, что излучение плазмы искрового разряда способствует более интенсивной модификации ароматических кислот, но при этом накопление продуктов гликозилирования белков идет медленнее по сравнению с УФ-излучением.

Дополнительно изучали влияние излучения плазмы искрового разряда и УФ-излучения на активность супероксиддисмутазы (СОД). При выбранных режимах воздействия не установлено повышения активности СОД. Наблюдается снижение активности СОД на 28,2% ( $p=0,008$ ) после воздействия длительностью 60 с излучением плазмы искрового разряда. Снижение активности СОД может быть связано со снижением количества радикалов за счет их рекомбинации между собой.

Для более детального изучения микровязкостных свойств мембран использовали флуоресцентный зонд пирен, коэффициент эксимеризации которого обратно пропорционален микровязкости (табл. 4).

Таблица 4.

Показатели микровязкости мембран клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением

Время воздействия, с	Излучение плазмы		УФ-излучение	
	Липидный бислой, отн. ед.	Белок-липидные взаимодействия, отн. ед.	Липидный бислой, отн. ед.	Белок-липидные взаимодействия, отн. ед.
<i>Без воздействия</i>	0,428 (0,359; 0,465)	0,419 (0,406; 0,438)	0,428 (0,359; 0,465)	0,419 (0,406; 0,438)
30	0,393 (0,351; 0,405)	<b>0,394 (0,377; 0,401)</b> * $p=0,022$	0,425 (0,376; 0,458)	0,404 (0,370; 0,424)
60	0,367 (0,331; 0,407)	<b>0,330 (0,322; 0,336)</b> * $p=0,008$	0,429 (0,381; 0,443)	0,393 (0,372; 0,409)
300	0,348 (0,309; 0,381)	<b>0,349 (0,325; 0,363)</b> * $p=0,014$	0,365 (0,360; 0,372)	<b>0,342 (0,337; 0,398)</b> * $p=0,014$
600	<b>0,328 (0,309; 0,345)</b> * $p=0,012$	<b>0,362 (0,340; 0,393)</b> * $p=0,008$	<b>0,342 (0,261; 0,349)</b> * $p=0,008$	<b>0,333 (0,325; 0,358)</b> * $p=0,012$
1200	<b>0,277 (0,240; 0,279)</b> * $p=0,008$	<b>0,360 (0,321; 0,393)</b> * $p=0,014$	<b>0,265 (0,207; 0,282)</b> * $p=0,008$	<b>0,305 (0,304; 0,306)</b> * $p=0,008$

Данные представлены в виде Me (25-й и 75-й процентиль). Статистически значимые различия: \* — по сравнению с контрольной группой.

Установлено, что режимы воздействия длительностью 600 и 1200 с, как излучением плазмы искрового разряда, так и УФ-излучением приводят к постепенному повышению микровязкости в липидном бислое на 23,4 – 35,3% и 20,1 – 38,1% соответственно. При режимах воздействия излучением плазмы искрового разряда длительностью 60, 300, 600 и 1200 с увеличивается микровязкость в области белок-липидных контактов на 6,0 – 21,2%. После воздействия УФ-излучением длительностью 300, 600 и 1200 с наблюдается увеличение микровязкости на 18,4 – 27,2%.

Основными причинами снижения текучести мембран является повышение содержания холестерина и увеличение соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Состояние жирных кислот фосфолипидов мембран обеспечивает текучие и пластические свойства бислоя. Поэтому дополнительно исследовали флюоресценцию зонда 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена, который позволяет проанализировать состояние гидрофобного углеводородного слоя мембран. После воздействия излучением плазмы искрового разряда длительностью 600 и 1200 с установлено снижение флуоресценции зонда 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена на 61,1% и 73,4% соответственно (рис. 5). Режимы воздействия УФ-излучением длительностью 600 и 1200 с приводят к увеличению флуоресценции зонда 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена на 37,4% и 25,7% соответственно.

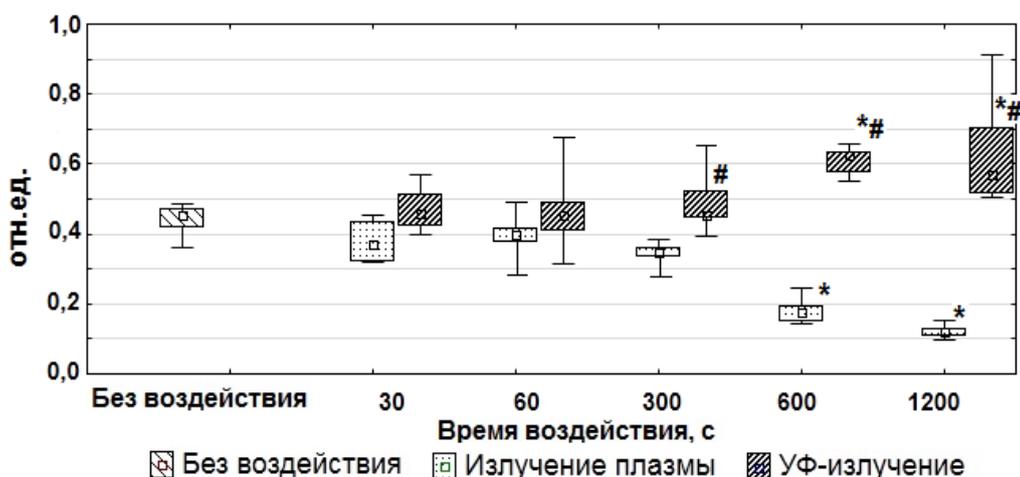


Рис. 5. Интенсивность флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена в бислое мононуклеарных перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: \* — по сравнению с контрольной группой,  $p \leq 0,05$ ; # — по сравнению с излучением плазмы,  $p \leq 0,05$

Таким образом, излучение плазмы искрового разряда и УФ-излучение разнонаправленно влияют на состояние жирных кислот фосфолипидов. Уменьшение флуоресценции зонда 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена связано со снижением упорядоченности углеводородных хвостов фосфолипидов, что приводит к увеличению неспецифической проницаемости клетки. Увеличение флуоресценции указывает на уплотнение фосфолипидного бислоя и снижение проницаемости мембраны.

Сиаловые кислоты – производные нейраминовой кислоты, являются одним из компонентов гликопротеидов и гликолипидов плазматических мембран, являются факторами узнавания, принимают участие в межклеточных взаимодействиях, миграции и адгезии клеток. Повышение уровня нейраминовых кислот в надосадочной жидкости отражает процессы десиалирования мембран клеток. После воздействия излучением плазмы искрового разряда установлено возрастание уровня сиаловых кислот при режиме 1200 с на 39,6% (рис. 6). После воздействия УФ-излучением длительностью 600 и 1200 с уровень сиаловых кислот возрастает на 68,4% и 50,0% соответственно.

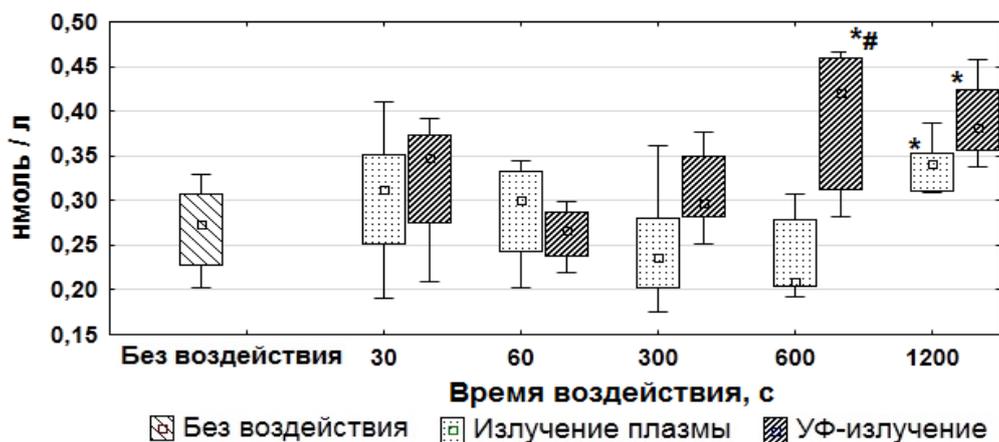


Рис. 6. Концентрация сиаловых кислот в надосадочной жидкости суспензии клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде  $Me \pm 25$ -й и 75-й процентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: \* — по сравнению с контрольной группой,  $p \leq 0,05$ ; # — по сравнению с излучением плазмы,  $p \leq 0,05$

Таким образом, излучение плазмы искрового разряда и УФ-излучение влияют на структурное состояние клеток, что может приводить к изменению функциональной активности, поэтому далее было изучено функциональное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток.

### 1.3. Влияние излучения плазмы искрового разряда и УФ-излучения на функциональное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток

Способность организма сохранять постоянство своего внутреннего состояния во многом зависит от полноценного функционирования клеток иммунной системы. Клетки перитонеальной полости необходимы для нормальной активности защитных сил организма, они обладают широким спектром функций и являются рецепторами любого внешнего воздействия.

Способность клеток к адгезии является важным свойством для полноценной реализации клетками своих функций. Воздействие излучением плазмы искрового разряда длительностью 30 и 60 с способствует возрастанию способности к адгезии мононуклеарных перитонеальных клеток на 53,7% и 24,4% соответственно (рис. 7). При длительных режимах воздействия: 600 и 1200 с, наблюдается снижение адгезивной способности на 84,9% и 85,3%. После воздействия УФ-излучением длительностью 30 с на 49,5% установлено возрастание способности к адгезии. При режимах длительностью 600 и 1200 с

наблюдается снижение адгезивной способности по сравнению с контрольной группой на 36,7% и 30,4% соответственно.

Излучение плазмы искрового разряда на 76,2% и 79,0% интенсивнее снижает адгезивную активность перитонеальных клеток по сравнению с УФ-излучением. Снижение адгезивных свойств клеток может быть связано, во-первых, с нарушением структуры под действием активных частиц, а во-вторых, с потерей сиаловых кислот и соответственно с изменением заряда мембран.

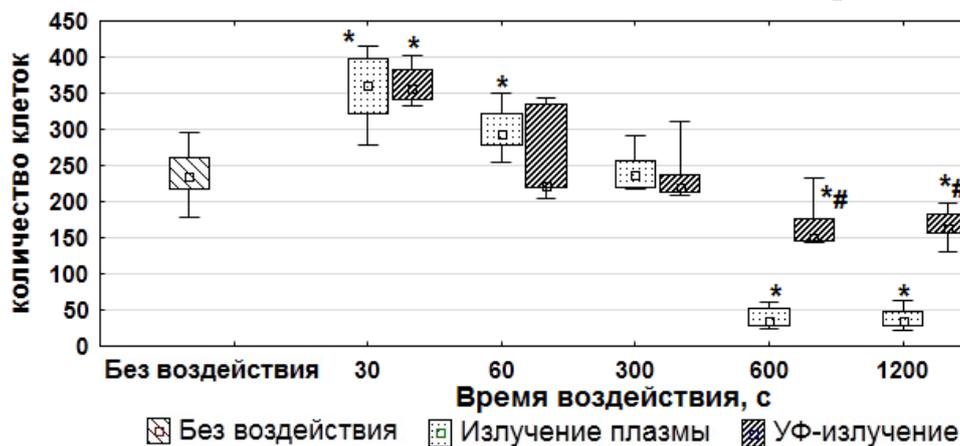


Рис. 7. Адгезивная способность клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде Me  $\pm$  25-й и 75-й процентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: \* — по сравнению с контрольной группой,  $p \leq 0,05$ ; # — по сравнению с излучением плазмы,  $p \leq 0,05$

Эффективность иммунного ответа определяется не только поглотительной способностью мононуклеарных фагоцитов, но и наличием в цитоплазме лизосом, содержащих гидролитические ферменты, такие как миелопероксидаза (МПО). Наблюдается снижение активности МПО после воздействия излучением плазмы искрового разряда в течение 600 и 1200 с на 69,0% ( $p=0,0013$ ) и 86,2% ( $p=0,0003$ ) соответственно. После воздействия УФ-излучением длительностью 1200 с установлено снижение активности МПО на 34,5% ( $p=0,0031$ ). При этом активность МПО после воздействия излучением плазмы длительностью 1200 с на 78,9% ( $p=0,0034$ ) ниже, чем после воздействия УФ-излучением. Известно, что в процессе генерации излучения плазмы искрового разряда происходит снижение pH и накопление азотсодержащих радикалов, вероятно, уменьшение активности МПО при длительных режимах воздействия связано с этими процессами.

На следующем этапе была исследована люминолзависимая хемилюминесценция (ЛЗХЛ), которая позволяет оценить образование клетками активных форм кислорода (АФК), зарегистрировать выработку АФК в динамике и оценить общее функциональное состояние фагоцитов.

После воздействия излучением плазмы искрового разряда в течение 60 и 300 с установлено возрастание уровня спонтанной ЛЗХЛ на 94,0% и 130,2% соответственно (рис. 8 А). При режимах воздействия длительностью 600 и 1200 с наблюдается тенденция к снижению уровня спонтанной ЛЗХЛ, отсутствует ярко выраженный пик, но время наступления максимального уровня ЛЗХЛ

сокращается на 72,2% и 77,8% соответственно. При воздействии УФ-излучением установлено возрастание уровня спонтанной ЛЗХЛ на 106,7 – 134,0% после воздействия длительностью 300, 600 и 1200 с. Но при воздействии длительностью 1200 с время наступления максимального уровня ЛЗХЛ увеличивается на 41,7%. Кроме того, при режимах воздействия УФ-излучением длительностью 600 и 1200 с уровень ЛЗХЛ в 2,8 и 3,2 раза выше по сравнению с излучением плазмы искрового разряда, а время наступления максимального уровня ЛЗХЛ выше в 2,6 и 6,4 раза.

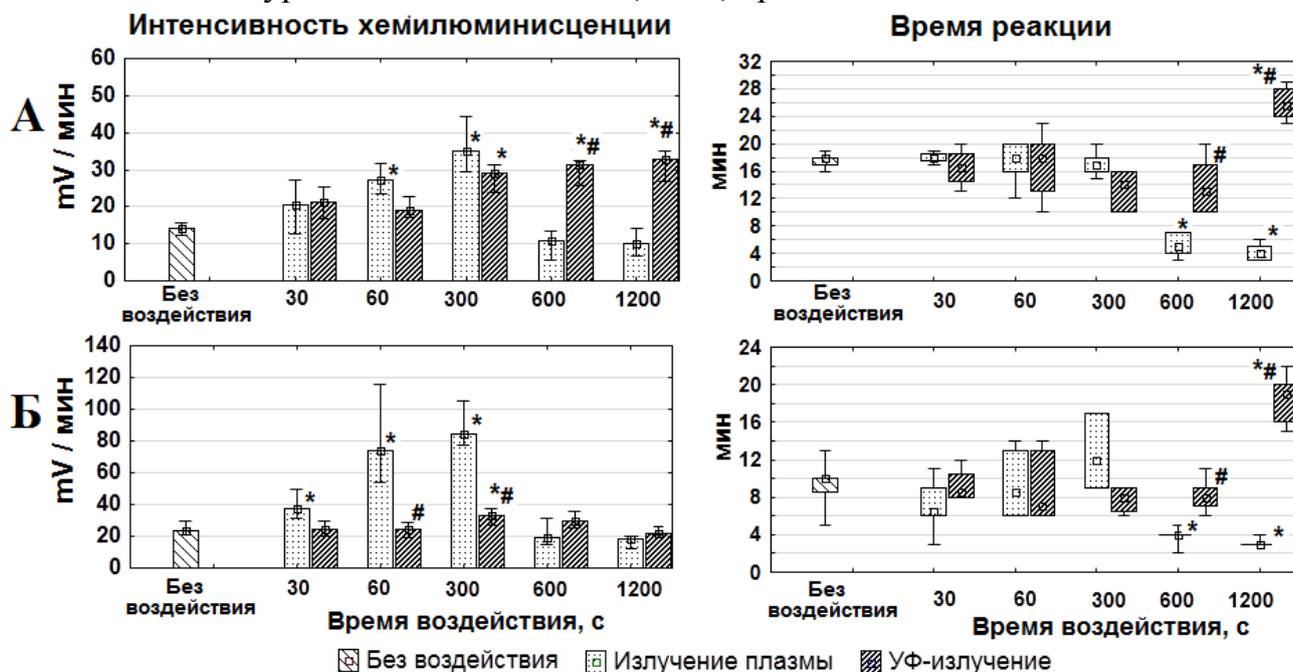


Рис. 8. Уровень спонтанной (А) и индуцированной (Б) люминолзависимой хемилюминесценции клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением.

Графики интенсивности хемилюминисценции представлены в виде  $Me \pm 25$ -й и 75-й процентиля. Графики времени реакции представлены в виде  $Me \pm 25$ -й и 75-й процентиля, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: \* — по сравнению с контрольной группой,  $p \leq 0,05$ ; # — по сравнению с излучением плазмы,  $p \leq 0,05$ .

Чтобы оценить потенциальную способность клеток отвечать на стимуляцию исследован уровень индуцированной ЛЗХЛ (рис. 8 Б). После воздействия излучением плазмы искрового разряда в течение 30, 60 и 300 с установлена активация ЛЗХЛ в 1,6 – 3,5 раза. Показано, что излучение плазмы при длительных режимах воздействия: 600 и 1200 с, снижает время наступления максимального уровня ЛЗХЛ, т.е. время наступления «кислородного взрыва» на 60% и 70% соответственно. УФ-излучение длительностью 300 с способствует активации индуцированной ЛЗХЛ на 43,0%. При режиме воздействия длительностью 1200 с время реакции увеличивается на 90%. При режимах воздействия УФ-излучением длительностью 60 и 300 с уровень индуцированной ЛЗХЛ в 3,1 и 2,8 раза ниже по сравнению с излучением плазмы искрового разряда, а время наступления «кислородного взрыва» при длительных временах воздействия выше в 2,0 и 6,3 раза.

Таким образом, излучение плазмы искрового разряда и УФ-излучение влияют на функциональное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток. При кратковременных режимах воздействия излучением плазмы искрового разряда установлено усиление, а при длительных режимах снижение функциональной активности клеток.

## **2. Влияние излучения плазмы искрового разряда на мононуклеарные перитонеальные клетки в эксперименте *in vivo***

Клетки перитонеальной полости являются чрезвычайно адаптируемыми клетками, которые реагируют на любые внешние воздействия. Реакция мононуклеарных перитонеальных клеток на воздействия *in vitro* хоть и позволяет оценить изменения в структурной организации и функциональной активности, но не может в полной мере охарактеризовать их поведение в организме. Поэтому далее мы изучали воздействие излучения плазмы искрового разряда в эксперименте *in vivo*.

Установлено, что выбранные режимы воздействия излучением плазмы искрового разряда не влияют на жизнеспособность, концентрацию сиаловых кислот в надосадочной жидкости и активность МПО.

Показано, что трехкратная обработка в течение 120 и 300 с способствует усилению адгезивных свойств клеток на 25,5% ( $p=0,002$ ) и 21,6% ( $p=0,013$ ) по сравнению с интактной группой и на 30,0% ( $p=0,005$ ) и 23,6% ( $p=0,005$ ) по сравнению с группой с однократной обработкой соответственно. Через 10 дней после завершения трехкратной обработки способность к адгезии восстанавливалась до уровня интактных животных.

Фагоцитоз является центральным звеном неспецифической защиты организма. Установлено, что однократное воздействие в течение 120 с способствует возрастанию фагоцитарного числа на 7,3% (табл. 5). Выявлено, что трехкратное воздействие в течение 120 и 300 с способствует активации фагоцитоза, что выражается в возрастании фагоцитарного индекса (ФИ) на 10,4% и 11,9%, и фагоцитарного числа (ФЧ) на 20,0% и 13,4% соответственно по сравнению с интактной группой, также показано возрастание ФИ на 7,2% и 17,2%, а ФЧ на 11,9% и 11,0% соответственно по сравнению с группой с однократной обработкой.

Изучение кислородзависимого метаболизма при постановке теста с нитросиним тетразолием позволяет оценить функциональную активность клеток и определить резерв метаболических процессов. Наблюдается возрастание позитивно реагирующих клеток при трехкратном воздействии в течение 120 и 300 с на 17,6% и 16,7% в спонтанном, и на 13,3% и 11,7% в активированном варианте НСТ-теста соответственно по сравнению с интактной группой (табл. 5). Выявлено увеличение индекса активации, отражающего активность ферментных систем, на 27,9% и 26,5% в спонтанном и на 10,3% и 9,2% в активированном варианте НСТ-теста соответственно.

Через 10 дней после завершения трехкратной обработки фагоцитарная и метаболическая активность клеток восстанавливалась до уровня интактных животных.

Таблица 5.

Фагоцитарная и метаболическая активность клеток  
после воздействия излучением плазмы

	контроль	однократное		трехкратное		отмена	
		120 с	300 с	120 с	300 с	120 с	300 с
ФИ, %	67,00 (67,00; 68,00)	69,00 (67,00; 69,00)	64,00 (62,00; 68,00)	<b>74,00 (74,00; 76,00) *#</b> p=0,011; 0,012	<b>75,00 (74,00; 76,00) *#</b> p=0,012; 0,037	64,00 (63,00; 67,00) & p=0,012	63,00 (62,00; 67,00) & p=0,037
ФЧ	2,75 (2,70; 2,82)	<b>2,95 (2,92; 2,98) *</b> p=0,012	2,81 (2,73; 2,84)	<b>3,30 (3,15; 3,33) *#</b> p=0,012; 0,012	<b>3,12 (3,12; 3,15) *#</b> p=0,012; 0,037	2,86 (2,81; 2,91) & p=0,022	2,74 (2,68; 2,81) & p=0,037
сп, %	51,00 (50,00; 52,00)	52,00 (51,00; 53,00)	53,00 (53,00; 53,50)	<b>60,00 (60,00; 62,00) *#</b> p=0,012; 0,012	<b>59,50 (59,00; 60,00) *#</b> p=0,013; 0,012	50,00 (50,00; 51,00) & p=0,012	52,00 (51,00; 53,50) & p=0,012
инд, %	60,00 (58,00; 60,00)	62,00 (60,00; 62,00)	61,50 (60,50; 63,00)	<b>68,00 (66,00; 68,00) *#</b> p=0,012; 0,012	<b>67,00 (65,50; 68,00) *#</b> p=0,014; 0,013	60,00 (59,00; 60,00) & p=0,012	62,00 (61,50; 64,00) & p=0,012
ИА сп	0,68 (0,67; 0,70)	0,70 (0,70; 0,71)	0,69 (0,66; 0,71)	<b>0,87 (0,87; 0,88) *#</b> p=0,011; 0,011	<b>0,86 (0,82; 0,88) *#</b> p=0,014; 0,013	0,68 (0,68; 0,69) & p=0,011	0,70 (0,70; 0,76) & p=0,012
ИА инд	0,87 (0,84; 0,88)	0,88 (0,87; 0,89)	0,90 (0,88; 0,91)	<b>0,96 (0,95; 1,04) *#</b> p=0,012; 0,012	<b>0,95 (0,94; 1,00) *#</b> p=0,014; 0,013	0,87 (0,82; 0,88) & p=0,012	0,89 (0,88; 0,91) & p=0,012
КМА	1,86 (1,85; 1,86)	1,85 (1,84; 1,86)	1,85 (1,84; 1,86)	<b>1,91 (1,89; 1,91) *#</b> p=0,012; 0,012	<b>1,89 (1,88; 1,91) *#</b> p=0,014; 0,013	1,85 (1,82; 1,85) & p=0,036	1,84 (1,84; 1,85) & p=0,041
ПР	1,16 (1,16; 1,18)	1,17 (1,16; 1,19)	1,17 (1,16; 1,18)	<b>1,10 (1,09; 1,12) *#</b> p=0,012; 0,012	<b>1,12 (1,10; 1,13) *#</b> p=0,014; 0,013	1,18 (1,18; 1,22) & p=0,036	1,20 (1,19; 1,20) & p=0,041

ФИ – фагоцитарный индекс; ФЧ – фагоцитарное число; сп % – спонтанный вариант НСТ-теста, инд % – активированный вариант НСТ-теста, ИАсп и ИАинд – индекс активности в спонтанном и активированном варианте; КМА – коэффициент метаболической активности; ПР – показатель резерва. Данные представлены в виде Me (25-й и 75-й процентиль). Статистически значимые различия: \* — по сравнению с интактной группой; # — по сравнению с группой с однократной обработкой; & – по сравнению с группой с трехкратной обработкой.

Таким образом, показано, что излучение плазмы искрового разряда не нарушает функциональное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток, а оказывает стимулирующее действие на клетки в эксперименте *in vivo*.

### Заключение

Полученные экспериментальные данные *in vitro* показывают, что кратковременные режимы (30, 60 и 300 с) воздействия излучением плазмы искрового разряда и УФ-излучением не влияют на количество и жизнеспособность мононуклеарных перитонеальных клеток. Длительные режимы воздействия (600 и 1200 с) излучением плазмы искрового разряда и УФ-излучением влияют на общее количество и жизнеспособность перитонеальных клеток, а также на параметры фазовых портретов: снижают

фазовую высоту, увеличивают диаметр и площадь клеток, что свидетельствует о наличии цитотоксического эффекта.

Цитотоксический эффект излучения плазмы и УФ-излучения связан с изменением структурного состояния клеток. С увеличением времени воздействия до 1200 с меняется липидный и фосфолипидный состав, при этом изменения липидного спектра не связаны с активацией процессов липопероксидации. Установлено, что в процессе генерации излучения искрового разряда и УФ-излучения наблюдается модификация ароматических аминокислот: тирозина и триптофана и накопление продуктов гликозилирования белков. При этом модификация ароматических аминокислот идет интенсивнее под действием излучения плазмы искрового разряда, а накопление продуктов гликозилирования белков медленнее по сравнению с УФ-излучением. В результате модификации белков и изменений в липидном спектре после воздействия излучением плазмы искрового разряда и УФ-излучения происходит структурная реорганизация плазматических мембран, что выражается в увеличении микровязкости клеток и изменении молекулярной организации жирных кислот фосфолипидов.

Изменения в структурном состоянии мембран отражаются на функциональной активности клеток. Происходит увеличение адгезивной способности клеток при кратковременных режимах воздействия и снижение при длительных режимах. Адгезия фагоцитов сопровождается респираторным «взрывом», что подтверждается результатами по оценке люминолзависимой хемилюминесценции. Показано, что при кратковременных режимах воздействия излучением плазмы происходит активация люминолзависимой хемилюминесценции как при спонтанном, так и при индуцированном варианте теста, а при длительных режимах наблюдается тенденция к снижению люминолзависимой хемилюминесценции. При этом время наступления «кислородного взрыва» уменьшается, тогда, как УФ-излучение увеличивает время наступления «кислородного взрыва».

Предполагаемый механизм активации и снижения функциональной активности клеток после воздействия излучением плазмы с учетом полученных результатов и данных литературы представлен на рисунке 9.

Увеличение функциональной активности перитонеальных клеток под действием излучения плазмы искрового разряда может быть связано с воздействием на специфические белки адгезии и активацией фосфолипазы A2 и фосфолипазы C, что приводит к полимеризации актиновых микрофиламентов и гидролизу фосфолипидов. В результате гидролиза фосфолипидов происходит образование арахидоновой кислоты, окисление которой приводит к образованию биологически активных соединений – эйкозаноидов, а также происходит активация фосфоинозитидного пути с образованием инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерола. Эйкозаноиды и инозитол-1,4,5-трифосфат являются сигналом для выхода  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. Под влиянием увеличения внутриклеточного  $Ca^{2+}$  происходит реорганизация цитоскелета и соответственно активация перитонеальных клеток.



Рис. 9. Предполагаемый механизм активации и снижения функциональной активности перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы. АК – арахидоновая кислота, АФК – активные формы кислорода, ДАГ – диацилглицерол, ФЛ А2 – фосфолипаза А2, ФЛ С – фосфолипаза С, IP3 - инозитол-1,4,5-трифосфат.

Примечание: красным цветом обозначены анализируемые параметры

Снижение функциональной активности перитонеальных клеток при длительных режимах воздействия излучением плазмы связано с изменениями фосфолипидного спектра, повышением микровязкости, десиалированием клеточной поверхности и модификацией белков. Нарушение целостности белково-липидного каркаса приводит к тому, что мембрана не может функционировать как единое целое, что вызывает снижение функциональной активности клеток.

В эксперименте *in vivo* показано, что после воздействия излучением плазмы искрового разряда не происходит нарушения функционального состояния мононуклеарных перитонеальных клеток. Наблюдается усиление адгезии, активация процессов фагоцитоза и кислородзависимого метаболизма, что свидетельствует о стимулирующем действии излучения плазмы на мононуклеарные перитонеальные клетки.

## Выводы

1. Кратковременные режимы воздействия излучением плазмы искрового разряда увеличивают адгезивную активность мононуклеарных перитонеальных клеток в 1,5 раза, активируют процессы образования активных форм кислорода клетками в 2 раза и повышают способность клеток отвечать на стимуляцию *in vitro*.
2. Длительные режимы воздействия излучением плазмы 600 и 1200 с снижают адгезивную способность мононуклеарных клеток на 85%, что сопровождается

увеличением средней площади клеток в 1,5 – 2 раза, содержанием эфиров холестерина на 14,9 – 31,4%, микровязкости мембран на 23,4 – 35,3%, модификацией ароматических аминокислот на 73,7 – 83,2% и процессов гликозилирования белков на 12,3 – 13,7%, а также снижением общего содержания фосфолипидов на 24,5 – 45,6% и упорядоченности жирнокислотных остатков липидов мембран на 61,1 – 73,4% соответственно.

3. В сравнении с излучением плазмы искрового разряда УФ-излучение при кратковременных режимах воздействия не активирует потенциальную способность перитонеальных клеток отвечать на стимуляцию. При длительном режиме УФ-излучение повышает упорядоченность жирнокислотных остатков липидов мембран, способствует образованию сшивок между углеводами и белками, менее интенсивно окисляет ароматические аминокислоты: тирозин и триптофан, в меньшей степени снижает адгезивную способность, увеличивает время наступления «кислородного взрыва» мононуклеарных перитонеальных клеток.

4. Трёхкратное воздействие излучением плазмы по 120 и 300 с в эксперименте *in vivo* увеличивает функциональную активность мононуклеарных перитонеальных клеток крыс: адгезивную способность на 25,5% и 21,6%, количество фагоцитирующих клеток на 10,4% и 11,9%, поглощательную способность на 20,0% и 13,4%, спонтанный и индуцированный кислородзависимый метаболизм на 17,6% и 16,7%, и на 13,3% и 11,7% соответственно.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

##### **Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК:**

1. Иванова, И.П. Анализ активных продуктов излучения плазмы искрового разряда, определяющих биологические эффекты в клетках / И.П. Иванова, С.В. Трофимова, Н. Карпель Вель Лейтнер, Н.А. Аристова, **Е.В. Архипова**, О.Е. Бурхина, В.А. Сысоева, И.М. Пискарев // Современные технологии в медицине. – 2012. – №2. – С. 20 – 30.
2. **Архипова, Е.В.** Воздействие некогерентного импульсного излучения на функциональное состояние мононуклеарных клеток в эксперименте / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // Современные технологии в медицине. – 2013. – Т.5, №1. – С. 27 – 31.
3. **Архипова, Е.В.** Структурное состояние мембран и функциональная активность перитонеальных макрофагов после воздействия газоразрядными устройствами / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т.9, №3. – С. 55 – 63
4. **Arkhipova, E.** Analysis of the adhesion activity of peritoneal macrophages after exposure to radiation from a gas-discharge plasma and mercury lamp / **E. Arkhipova**, I. Piskarev, I. Ivanova // General Physiology and Biophysics. – 2018. – Vol. 37, № 6. – P. 695 – 702
5. **Архипова, Е.В.** Влияние излучения плазмы искрового разряда на функциональное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток в эксперименте *in vivo* / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // Естественные и

технические науки. – 2021. – № 10 – С. 81 – 84

**Статьи в других изданиях:**

1. Кирилов, А.А. Влияние высокоэнергетического некогерентного импульсного излучения на уровень ОМБ лимфоцитов и клеток лимфосаркомы Плиса / А.А. Кирилов, В.В. Елагин, **Е.В. Кочкурова** // Материалы Десятой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» 20 – 21 апреля 2007 г., С.-Петербург. – С. 195–196.
2. **Кочкурова, Е.В.** Фагоцитарная активность клеток крови крыс после высокоэнергетического импульсного воздействия / **Е.В. Кочкурова**, И.П. Иванова // Проблемы и перспективы современной науки, сборник научных трудов. – Томск, Т.1, Вып. 2. 2008 г. – С. 56.
3. **Кочкурова, Е.В.** Функциональное состояние лимфоцитов периферической крови крыс с экспериментальными опухолями при высокоэнергетических воздействиях / **Е.В. Кочкурова**, И.П. Иванова // Высокоинтенсивные физические факторы в биологии, медицине, сельском хозяйстве и экологии. Труды международной конференции. – Саров, 2009. – С. 68–75.
4. **Архипова, Е.В.** Влияние плазмы искрового разряда на функциональный потенциал перитонеальных макрофагов в эксперименте *in vitro* / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // Материалы международной научно-практической конференции «Наука сегодня: реальность и перспективы». – Вологда, 2016. – С. 14–15.
5. **Архипова, Е.В.** Липидный спектр перитонеальных макрофагов после воздействия излучением газоразрядной плазмы / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // Материалы XI международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии». – Севастополь, 2016. – Т.2. – С. 54–56.
6. **Архипова, Е.В.** Перекисное окисление липидов перитонеальных макрофагов после воздействия излучением газоразрядной плазмы / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // Биосистемы: организация, поведение и управление: Тезисы докладов 69-й Всероссийской школы-конференции молодых ученых. – Н. Новгород: Университет Лобачевского. – 2016. – С. 11
7. **Архипова, Е.В.** Изменение микровязкости мембран перитонеальных макрофагов после воздействия излучением газоразрядной плазмы / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова, И.М. Пискарев // Сборник статей Международной научно-практической конференции «Инновационная наука: прошлое, настоящее, будущее». – Саранск, 2016. – С. 8–10.
8. **Архипова, Е.В.** Микровязкость и перекисное окисление липидов перитонеальных макрофагов после воздействия УФ-излучения и излучения газоразрядной плазмы / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т.16, №4. – С. 46 – 47.
9. **Архипова, Е.В.** Влияние излучения плазмы искрового разряда и УФ-излучения на структурно-функциональное состояние перитонеальных макрофагов / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // Журнал Медиаль. – 2017. – №1 (19). – С. 354–355.
10. **Архипова, Е.В.** Структурно-метаболические характеристики перитонеальных макрофагов после физических воздействий / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // Биосистемы: организация, поведение и управление: Тезисы докладов 70-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. – Н. Новгород: Университет Лобачевского. – 2017. – С. 13.
11. **Архипова, Е.В.** Адгезивные свойства перитонеальных макрофагов после физических воздействий / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // Материалы XXIII съезда Физиологического общества имени И.П. Павлова. – Воронеж: Издательство

«ИСТОКИ», 2017. – С. 844–846.

12. **Архипова, Е.В.** Оценка надмембранных структур перитонеальных макрофагов после УФ-излучения / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // Взаимодействие науки и общества: проблемы и перспективы: сборник статей по итогам Международной научно-практической конференции. – Стерлитамак: АМИ, 2017. – Ч.3. – С. 4–6

13. **Архипова, Е.В.** Флуоресценция 1,6 – дифенилгексатриена в бислое перитонеальных макрофагов после УФ-излучения / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // сборник научных трудов по материалам XXIV Международной научно-практической конференции «EUROPEAN RESEARCH: INNOVATION IN SCIENCE». – М.: Издательство «Олимп», 2017. – С. 37–40.

14. **Архипова, Е.В.** Активность миелопероксидазы перитонеальных макрофагов после воздействия газоразрядными устройствами / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // Тенденции развития современного естествознания и технических наук: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции. – Белгород: ООО АПНИ, 2017. – Часть I. – С. 43–45.

15. **Архипова, Е.В.** Активность супероксиддисмутазы перитонеальных макрофагов после УФ-излучения / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // Материалы международной научно-практической конференции «Наука сегодня: реальность и перспективы». – Вологда, 2017. – С. 128–129.

16. **Архипова, Е.В.** Применение метода интерференционной микроскопии для прижизненного анализа клеток после физических воздействий / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // Биосистемы: организация, поведение и управление: Тезисы докладов 71-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. – Н. Новгород: Университет Лобачевского. – 2018. – С. 25.

17. **Архипова, Е.В.** Применение модуляционной интерференционной микроскопии для оценки структурного состояния перитонеальных макрофагов / **Е.В. Архипова**, И.П. Иванова // XXXI Международная школа-симпозиум по голографии, когерентной оптике и фотонике: материалы школы-симпозиума / под ред. д.т.н. А.П. Владимирова: УрФУ им. Б.Н. Ельцина. - Екатеринбург, 2019. – С. 62 – 63

18. **Архипова, Е.В.** Функциональное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы искрового разряда / **Архипова, Е.В.** Иванова И.П. // Сборник тезисов VII Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VOLGAMEDSCIENCE»: материалы конференции. — Н.Новгород: Издательство Приволжского исследовательского медицинского университета, 2021. – С. 56 – 58

### Список сокращений

АФК – активные формы кислорода

ЛЗХЛ – люминолзависимая хемилюминесценция

МПО – миелопероксидаза

СОД – супероксиддисмутаза

ФИ – фагоцитарный индекс

ФЛ – фосфолипиды

ФЧ – фагоцитарное число

ХС – холестерин

ХС/ФЛ – соотношение холестерина к суммарному количеству фосфолипидов

ЭХС – эфиры холестерина