

УДК 576 57.043 537.5

АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИЗЛУЧЕНИЯ ПЛАЗМЫ ИСКРОВОГО РАЗРЯДА

Трофимова С.В., Иванова И.П., Бугрова М.Л.

ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России», Нижний Новгород, e-mail: trofimova_s_v@mail.ru

Проведен электронно-микроскопический анализ структурных изменений прокариотических и эукариотических клеток под действием излучения плазмы искрового разряда. Эксперименты выполнены на бактериальных штаммах антибиотико-резистентных грамположительных микроорганизмов *Staphylococcus aureus* 5913 и грамотрицательных микроорганизмов *Escherichia coli* 775-3, эритроцитах крови крыс, лимфоидных клетках, эпителиальных клетках протоков молочной железы. Согласно предшествующим исследованиям были выбраны биологически значимые времена обработки. Было показано, что излучение плазмы искрового разряда оказывает повреждающее действие на все типы клеток. В бактериальных клетках наблюдается отслоение клеточной стенки и деградация нуклеоида. В эритроцитах происходит порация цитоплазматической мембраны, сопровождающаяся выходом клеточного содержимого. В лимфоидных клетках и клетках протоков молочной железы наблюдается деградация клеточного содержимого, цитоплазматической и ядерной мембран.

Ключевые слова: излучение плазмы искрового разряда, электронная микроскопия, *Staphylococcus aureus* 5913, *Escherichia coli* 775-3, эритроциты, лимфоидные клетки, эпителиальные клетки протоков молочной железы

THE ANALYSIS OF STRUCTURAL CHANGES OF PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC CELL UNDER THE INFLUENCE OF PLASMA SPARK RADIATION

Trofimova S.V., Ivanova I.P., Bugrova M.L.

Nizhny Novgorod Syaye Medical Academy, Nizhny Novgorod, e-mail: trofimova_s_v@mail.ru

The electron-microscopic analysis of structural changes of prokaryotic and eukaryotic cells under the influence of plasma spark radiation was carried out. The experiments were performed on bacterial cultures of antibiotic-resistant Gram-positive microorganisms *Staphylococcus aureus* 5913 and Gram-negative microorganisms *Escherichia coli* 775-3, erythrocytes of rats blood, lymphoid cells, epithelial cells of mammary gland ducts. According to previous researches biologically significant times of processing were chosen. It was shown that plasma spark radiation has damaging effect on all types of cells. The exfoliation of cellular wall and nucleoid degradation were observed in bacterial cells. The poration of the cytoplasmic membrane and exit of cellular contents were shown in erythrocytes. The degradation of cellular contents, cytoplasmic and nuclear membranes is observed in lymphoid cells and epithelial cells of mammary gland ducts.

Keywords: plasma spark radiation, electron microscopy, *Staphylococcus aureus* 5913, *Escherichia coli* 775-3, erythrocytes, lymphoid cells, epithelial cells of mammary gland ducts

В последние десятилетия, как в России, так и за рубежом, ведутся активные исследования биологических эффектов низкотемпературной газоразрядной плазмы. Одной из привлекательных особенностей неравновесной плазмы является возможность использовать в биологических процессах энергию электронов, которая значительно выше, чем у ионов и нейтральных частиц, образующихся в газовой фазе. Электроны с высокой энергией вступают в столкновения с фоновым газом, в результате чего инициируются процессы диссоциации, возбуждения и ионизации. Поскольку ионы и нейтралы остаются относительно холодными, плазма не вызывает термических повреждений. Это открывает возможность использовать плазму для стерилизации термочувствительных материалов, включая биологические объекты, такие как клетки и ткани. Из всех возможных факторов, генерируемых плазмой, в биологиче-

ских эффектах могут участвовать: тепло, заряженные частицы, реактивные нейтралы и электромагнитные излучения, но в основном это долгоживущие радикалы, напрямую взаимодействующие с биологическими субстратами. Согласно литературным данным стерилизация плазмой электрических разрядов высокоэффективна и сравнима с используемыми химическими методами (хлорирование, фторирование или озонирование) и с УФ-облучением. Однако применение сильных окислителей (хлор, озон) для разложения органических соединений приводит к появлению вторичных соединений (хлорорганика, озониды), являющихся токсичными для человека и животных. Озон является токсическим газом. Обработка УФ-излучением, как известно, высокоэффективна, но требует длительных временных режимов и многие условнопатогенные микроорганизмы способны выживать после кварцевания.

Газоразрядная плазма контактирует только с поверхностью объекта, а некогерентное излучение плазмы искрового разряда может проникать внутрь объекта и вызывать повреждения надклеточных и внутриклеточных структур. К настоящему моменту установлено, что низкотемпературная газоразрядная плазма обладает бактерицидным и цитотоксическим действием, но механизмы этих эффектов оценивались по пролиферативной активности микроорганизмов, количеству нежизнеспособных клеток или с помощью конфокального микроскопа [5, 6]. Детальный электронно-микроскопический анализ структурных изменений прокариотических и эукариотических клеток под действием излучения плазмы не проводился. В связи с этим целью исследования была оценка структурного состояния прокариотических и эукариотических клеток после воздействия излучением низкотемпературной газоразрядной плазмы в экспериментах *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на бактериальных штаммах антибиотико-резистентных грамположительных микроорганизмов *Staphylococcus aureus* 5913 и грамотрицательных микроорганизмов *Escherichia coli* 775-3, эритроцитах крови крыс, лимфоидных клетках, эпителиальных клетках протоков молочной железы. Бактериальные штаммы получены из музея кафедры микробиологии и иммунологии НижГМА. Штаммы лимфоидных клеток и эпителиальных клеток протоков молочной железы приобретены в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН г. Москва. Эритроциты получали путем центрифугирования гепаринизированной крови белых беспородных крыс при 3000 об./мин.

Для анализа готовились клеточные суспензии в растворе Хенкса с концентрацией 10^7 клеток в 1 мл.

Суспензии клеток обрабатывали излучением плазмы искрового разряда в различных временных режимах, выбранных на основании литературных данных.

Формирование импульсного искрового разряда, генерирующего излучение низкотемпературной плазмы, осуществляли с помощью экспериментального устройства ПИЛИМИН серии ИР-10. Устройство разработано в НИИ ядерной физики имени Д.В. Скобельцына МГУ имени М.В. Ломоносова в 2011 году. Характеристики используемого разряда: емкость импульсного конденсатора $C = 3,3$ нФ, балластное сопротивление $R = 10$ МОм, напряжение источника питания $U_{\text{ин}} = 11$ кВ, частота повторения импульсов – 10 Гц.

Для электронно-микроскопического анализа суспензии необработанных и обработанных клеток центрифугировали, отбирали супернатант. Клетки фиксировали в 2,5%-м растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (рН = 7,4) и в 1%-м растворе четырехоксида осмия. Материал обезвоживали в спиртах восходящей концентрации с последующей заливкой в смесь аралдита и эпона 812 [3]. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на Ultracut UC7 фирмы «Leica». Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим и фуксином. Ультратонкие срезы

контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали на трансмиссионном электронном микроскопе Morgagni 268D фирмы FEI. С помощью видеокамеры Mega View изображение выводили на экран компьютера и работали в программе AnalySIS.

Результаты исследования и их обсуждение

Общими чертами импульсных высокоэнергетических разрядов является то, что они формируются за счет преобразования энергии электромагнитного поля (ЭМП) и электрического разряда в потоки частиц с энергией от 0,5 до 100 Дж. Энергия ускоренных частиц – это кинетическая энергия, которую приобретает заряженная частица, несущая один элементарный заряд (заряд электрона), при перемещении в электрическом поле между двумя точками с разностью потенциалов в 1 В ($1 \text{ эВ} = 1,60219 \cdot 10^{-19}$ Дж = $4,45 \cdot 10^{-12}$ кал).

В процессе формирования и развития электрического разряда в воздухе происходят процессы химических преобразований с различными атомами, молекулами, активными радикалами и ионами. Все физико-химические процессы, происходящие в плазме газового разряда, можно разделить на три временных интервала: 10^{-15} с – процессы возбуждения атомов и молекул электронным или фотонным ударом; 10^{-13} с – процессы ионизации и диссоциации атомов и молекул; до 10^{-3} с – стадия химических процессов и реакций.

При протекании реакции по стадиям производятся и расходуются так называемые промежуточные вещества – ионы, возбужденные молекулы, свободные радикалы. Радикалы – это молекулы в особом состоянии, когда происходит разрыв связи между атомами, молекулы приобретают свободные валентные связи. В результате свободные радикалы получают некоторую избыточную потенциальную энергию по сравнению с исходными молекулами. Как следствие, это приводит к увеличению химической активности.

Радикальные формы молекул и атомов служат передатчиками энергии от электронов плазмы к активным (ионизируемым или диссоциируемым) атомам или молекулам.

Известно, что под действием разряда в пробах воды снижается рН, накапливаются окислители и восстановители, ионы NH_4^+ , идентифицированы радикалы HO_2^\cdot и нитрозамины. Под действием искрового электрического разряда на воздухе доказано образование нитросоединений, содержащих группы CN, NH, и органических соединений, содержащих группы CH, CS [7]. Активные продукты, образующиеся

в жидкой и газовой фазе разряда, вероятно, образуются и внутри клетки. Оксиды азота и радикальные продукты участвуют во многих метаболических процессах, в частности таких, как апоптоз и пролиферация клеток. В предыдущих работах показано, что воздействие излучением плазмы приводит к интенсификации окислительной модификации белков, деградации поверхностных углеводных структур клеток, изменению внутриклеточного рН, увеличению гидрофобности мембран клеток, изменениям в работе электрон-транспортной цепи [1]. В связи с этим логическим продолжением исследований в данном направлении является электронно-микроскопическая оценка структурных изменений клеток под действием излучения плазмы.

Клеточная оболочка бактерий состоит из клеточной стенки и находящейся под ней цитоплазматической мембраны. Клеточная стенка грампозитивных бактерий на 90% состоит из пептидогликана, пронизанного тейхоевыми и липотейхоевыми кислотами, грамотрицательных – 10–20% пептидогликана, фосфолипиды, липополисахариды и белки [2]. Вероятно, действию факторов плазмы в первую очередь будет подвергаться клеточная стенка бактерий, повреждения которой могут приводить к нарушению жизненно важных функций клетки и, как следствие, привести к её гибели. При электронно-микроскопическом анализе выявлено, что под действием излучения плазмы происходит набухание клеток, что, вероятнее всего, связано с нарушением водно-солевого баланса, наблюдается отслоение клеточной стенки, более выраженное для грамположительных бактерий, происходит деградация нуклеоида. Структурные изменения бактериальных клеток согласуются с литературными данными о метаболических изменениях в прокариотических клетках под действием излучения плазмы [1].

Исследуя влияние физико-химических факторов на эритроциты, можно судить непосредственно о состоянии цитоплазматических мембран.

В контрольной серии преобладают эритроциты округлой формы, плотно наполненные содержимым. После воздействия излучением плазмы на эритроциты в течение 15 минут наблюдалось увеличение числа эритроцитов измененной формы, к 30 минутам обработки отмечается уменьшение количества внутриклеточного содержимого во всех эритроцитах. Данные электронно-микроскопического анализа согласуются с литературными данными, указывающими на порацию клеточных мембран под дей-

ствием низкотемпературной газоразрядной плазмы [4].

Так как электронно-микроскопически была показана деградация нуклеоида прокариотических клеток, можно предположить, что ядро и ядерный аппарат эукариотических клеток также подвергается действию излучения плазмы искрового разряда. И поэтому для дальнейшего анализа были выбраны лимфоидные клетки и эпителиальные клетки протоков молочной железы.

В контрольной серии лимфоидные клетки преобладают округлой формы с крупным ядром. Под действием излучения плазмы в клетках наблюдается разреженность клеточного содержимого. С увеличением времени воздействия происходит нарушение целостности поверхностной и ядерной мембран, образуются поры.

В контрольной серии эпителиальные клетки протоков молочной железы имеют овально-округлую форму с крупным ядром, хроматин которого имеет мелкозернистую структуру. Ядрышки крупные. После воздействия излучением плазмы в течение 15 минут в клетках наблюдаются вакуолизация внутриклеточного содержимого и деформация ядерной мембраны, к 30 минутам обработки происходит разрыв ядерной мембраны.

В лимфоидных клетках и эпителиальных клетках протоков молочной железы после воздействия излучением плазмы наблюдаются как апоптотические, так и некротические процессы.

Выводы

1. Под действием излучения плазмы искрового разряда в прокариотических клетках наблюдаются отслоение клеточной стенки и деградация нуклеоида

2. Влияние излучения плазмы искрового разряда вызывает порацию цитоплазматической мембраны эритроцитов и выход клеточного содержимого

3. В эукариотических клетках под действием излучения плазмы искрового разряда наблюдаются деградация клеточного содержимого, порация цитоплазматической и ядерной мембран, апоптотические и некротические процессы

Список литературы

1. Иванова И.П., Трофимова С.В., Пискарев И.М. Исследование механизмов биоцидного действия излучения плазмы искрового разряда // Современные технологии в медицине. – 2012. – № 2. – С. 20–30.
2. Поздеев О.К. Медицинская микробиология: учебное пособие / под ред. В.И. Покровского. – 4-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 768 с.

3. Саркисов Д.С., Петров Ю.Л. Руководство. Микроскопическая техника. – М.: Медицина, 1996. – 556 с.

4. Beebe S.J., Fox P.M., Rec L.J., Willis E.L.K., Schoenbach K.H. Nanosecond, high intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells // *FASEB J.* – 2003. – Vol. 17. – P. 1493–1495.

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

6. Laroussi M. Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art // *Plasma Process. Polym.* – 2005. – Vol. 5. – P. 391–400.

7. Piskarev I.M., Ivanova I.P., Trofimova S.V. Formation of Active Species in Spark Discharge and Their Possible Use // *High Energy Chemistry.* – 2012. – Vol. 46. – № 5. – P. 406–411.

References

1. Ivanova I.P., Trofimova S.V., Piskaryov I.M. The study of biocidal mechanisms of spark discharge plasma – *Sovremennye tekhnologii v medicine*, 2012, no 2, pp. 20–30.

2. Pozdeev O.K. *Medecinskaya mikrobiologiya: uchebnoe posobie / Pod red. V.I. Pokrovskogo.* M: GEOTAR-Media, 2008, 768 p.

3. Sarkisov D.S., Petrov YU. L. *Rukovodstvo. Mikroskopicheskaya tekhnika.* M: Medicina, 1996, 556 p.

4. Beebe S.J., Fox P.M., Rec L.J., Willis E.L.K., Schoenbach K.H. Nanosecond, high intensity pulsed electric fields

induce apoptosis in human cells – *FASEB J.*, 2003, Vol. 17, pp. 1493–1495.

5. Kieft E., Darios D., Roks A. J. M., Stoffels E. Plasma treatment of mammalian vascular cells: A quantitative description – *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 2005. Vol. 3, no. 2. pp. 771–775.

6. Laroussi M. Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art – *Plasma Process. Polym.*, 2005, Vol. 5, pp. 391–400.

7. Piskarev I.M., Ivanova I.P., Trofimova S.V. Formation of Active Species in Spark Discharge and Their Possible Use – *High Energy Chemistry*, 2012, Vol. 46, no. 5, pp. 406–411.

Рецензенты:

Заславская М.И., д.б.н., профессор кафедры микробиологии ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Н. Новгород;

Снопина Л.Б., д.б.н., зав. отделом морфологии центральной научной исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Н. Новгород.

Работа поступила в редакцию 17.12.2012.