

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ БИОЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ ИЗЛУЧЕНИЯ ПЛАЗМЫ ИСКРОВОГО РАЗРЯДА

УДК 579.66:621.6

Поступила 2.05.2012 г.



И.П. Иванова, д.б.н., зав. научно-проблемной лабораторией физико-химических исследований НИИ ПФМ¹;

С.В. Трофимова, младший научный сотрудник научно-проблемной лаборатории физико-химических исследований НИИ ПФМ¹;

И.М. Пискарев, к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник²;

О.Е. Бурхина, студентка кафедры биомедицины³;

В.А. Сысоева, студентка кафедры биомедицины³;

Н. Карпель Вель Лейтнер, д.х.н., старший научный сотрудник лаборатории химии и микробиологии воды⁴

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²НИИ ядерной физики им. Д.В. Скобельцына Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992, Ленинские горы;

³Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского —

Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

⁴Университет Пуатье, Пуатье, Франция, 86022, Recteur Pineau Avenue, 40

Цель исследования — изучение механизмов биоцидного действия излучения плазмы искрового разряда.

Материалы и методы. Обработку суспензий исследуемых бактериальных штаммов проводили при оптимальных условиях разряда: емкость импульсного конденсатора $C=3,3$ нФ, балластное сопротивление $R=10$ МОм, напряжение источника питания $U_{ин}=11$ кВ, частота повторения импульсов — 10 Гц.

Биоцидный эффект излучения плазмы оценивали по количеству колониеобразующих единиц. Анализ интенсивности окислительных процессов в прокариотических клетках после воздействия излучением плазмы проводили по относительной концентрации продуктов перекисного окисления липидов и уровню флуоресценции битирозина, триптофана и гликозилированных белков, изменение гидрофобности мембран клеток исследовали по интенсивности флуоресценции зонда 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена. Характер метаболических изменений в клетках после воздействия излучением плазмы изучали по интенсивности флуоресценции пиридиновых нуклеотидов, состояние поверхностных структур — по концентрации сиаловых кислот во внеклеточной среде. Изменение внеклеточного pH оценивали pH-метрически, анализ внутриклеточного pH проводили флуориметрически с использованием зонда флуоресцеина.

Результаты. Установлено 100% ингибирование роста грамположительных и грамотрицательных бактерий после воздействия излучением плазмы искрового разряда в течение 60 с. Обнаружено, что поверхностные углеводные структуры грамположительных бактерий в большей степени подвергаются деструкции. Зарегистрировано увеличение гидрофобности мембран и внутриклеточного pH после обработки суспензии бактериальных клеток. Выявлено снижение уровня молекулярных продуктов перекисного окисления липидов. Показано, что белки грамположительных бактерий подвергаются более выраженной окислительной модификации, чем белки грамотрицательных бактерий. Установлено, что после воздействия излучением плазмы в клетках преобладают пиридиновые нуклеотиды в окисленном состоянии.

Ключевые слова: излучение плазмы искрового разряда, *S. aureus*, *E. coli*, окисление биомолекул, внутриклеточный pH.

English

The study of biocidal mechanisms of spark discharge plasma radiation

I.P. Ivanova, D.Bio.Sc., Head of the Fundamental Research Laboratory of Physicochemical Studies, Scientific Research Institute of Applied Fundamental Medicine¹;

S.V. Trofimova, Junior Research Worker, Fundamental Research Laboratory of Physicochemical Studies, Scientific Research Institute of Applied Fundamental Medicine¹;

I.M. Piskaryov, PhD, Leading Research Worker²;

O.E. Burkina, Student, the Department of Biomedicine³;

V.A. Sysoeva, Student, the Department of Biomedicine³;

N. Karpel Vel Leitner, D.Chem.Sc., Senior Research Worker, Laboratory of Chemistry and Microbiology of Water⁴

Для контактов: Иванова Ирина Павловна, тел. раб. 8(831)465-42-81, тел. моб. +7 920-059-40-28; e-mail: ivanova.ip@mail.ru

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005;

²Scientific Research Institute of Nuclear Physics named after D.V. Skobeltsyn, Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Leninskiye Gory, Moscow, Russian Federation, 119992;

³Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky — National Research University, Gagarin Avenue, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950;

⁴Poitiers University, Recteur Pineau Avenue, 40, Poitiers, France, 86022

The aim of the investigation is to study the biocidal mechanisms of spark discharge plasma radiation.

Materials and methods. The suspensions of studied bacterial strains were treated in optimal discharge conditions: pulse capacitor capacity $C=3.3$ nF, ballast resistance $R=10$ MOhm, power supply voltage $U_{PS}=11$ kV, pulse recurrence frequency — 10 Hz.

Biocidal effect of plasma radiation was estimated by the number of colony-forming units. The analysis of oxidative process intensity in pro-cariotic cells after plasma radiation exposure was performed according to relative concentration of lipid peroxidation products and fluorescence level of tyrosine, tryptophan and glycosylated proteins, cell membrane hydrophobicity change was studied by fluorescence intensity of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene. The character of metabolic changes in cells after plasma radiation exposure was studied by pyridine nucleotides fluorescence intensity, surface structures condition — by the concentration of sialic acids in extracellular medium. Extracellular pH change was assessed pH-metrically, and intracellular pH was analyzed by means of fluorometry, using fluorescein probe.

Results. 100% gram-positive and gram-negative bacteria growth inhibition was found after plasma radiation exposure within 60 s. Surface carbohydrate structures of gram-positive bacteria were revealed to be destroyed to a greater degree. There was observed the increase of membrane and intracellular pH hydrophobicity after the treatment of bacterial cells suspension. The level decrease of molecular products of lipid peroxidation was found. The proteins of gram-negative bacteria were shown to be exposed to more pronounced oxidative modification than those of gram-positive ones. Pyridine nucleotides in oxidized condition were found to prevail in cells after plasma radiation exposure.

Key words: spark discharge plasma radiation, *S. aureus*, *E. coli*, biomolecules oxidation, intracellular pH.

Вопрос о применении газоразрядной холодной плазмы в биологии и медицине обсуждается около 20 лет, с тех пор как ученым стали доступны устройства, генерирующие плазму в условиях лаборатории. 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 [1, 2]. Поскольку ионы и нейтралы остаются относительно холодными, плазма не вызывает термических повреждений [3]. Это открывает возможности использования плазмы для стерилизации термочувствительных материалов, включая биологические объекты, такие как клетки и ткани [4–6]. Однако плазма контактирует только с поверхностью объекта, а некогерентное излучение плазмы искрового разряда может проникать внутрь объекта. Из всех возможных факторов, генерируемых плазмой, в биологических эффектах могут участвовать: тепло, заряженные частицы, реактивные нейтралы и электромагнитные излучения, но в основном это долгоживущие радикалы, напрямую взаимодействующие с биологическими субстратами [7]. Несмотря на активное исследование бактерицидного эффекта низкотемпературной плазмы, механизмы ее цитотоксического действия до сих пор не изучены.

Цель исследования — изучение механизмов биоцидного действия излучения плазмы искрового разряда.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на бактериальных штаммах антибиотикорезистентных грамположительных микроорганизмов *Staphylococcus aureus* 5913 и грамотрицательных микроорганизмов

Escherichia coli 775-3. Бактериальные штаммы получены из музея кафедры микробиологии и иммунологии НижГМА. Для анализов предварительно готовили суточную культуру микроорганизмов. Затем бактериальные клетки ресуспендировали в растворе Хенкса до концентрации $(10-15) \cdot 10^6$ клеток в 1 мл.

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

На первом этапе эксперимента проведена оценка подавления роста бактериальных клеток после воздействия излучением плазмы. Для этого выполняли посев сплошным газоном на твердый агар, затем чашки Петри обрабатывали излучением плазмы в течение 5, 10, 15, 30, 60, 120, 300, 600 с. После чего образцы термостатировали в течение суток при температуре 37°. Биоцидный эффект оценивали по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ).

На втором этапе исследования оценивали структурно-функциональные изменения бактериальных клеток после воздействия излучением плазмы. Суспензию клеток объемом 4 мл обрабатывали излучением плазмы в течение 15, 30 и 60 с (толщина слоя около 3,5 мм). Расстояние до области разряда — 2 см. Во взвеси клеток определяли внеклеточную концентрацию сиаловых кислот, интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) — диеновые конъюгаты (ДК), триеновые конъюгаты (ТК), основания Шиффа (ОШ), уровень

флюоресценции битирозина, триптофана, гликозилированных белков, НАДН и липофильного зонда 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена (ДФГ), изменение внеклеточного и внутриклеточного рН.

Экстракцию липидов из анализируемого материала проводили методом Folch [8]. Уровень общих липидов измеряли с помощью набора TOTOL LIPIDS BIO-LACHEMA-TEST (PLIVA-Lachema Diagnostica, Чехия) спектрофотометрически при длине волны 540 нм. Диеновые и триеновые конъюгаты определяли спектрофотометрически по максимумам поглощения сопряженных двойных связей при длинах волн 233 и 275 нм соответственно [9]. Уровень оснований Шиффа оценивали по интенсивности флюоресценции при длине волны возбуждения 345 нм, длине волны регистрации 450 нм [10]. Уровень ДК, ТК и ОШ относили к количеству липидов и выражали в относительных единицах.

Концентрацию сиаловых кислот определяли в надосадочной жидкости с помощью набора реагентов Силотест-80Т (НПЦ Эко-Сервис, С.-Петербург, Россия) спектрофотометрически при длине волны 532 нм.

Концентрацию общего белка измеряли биуретовым методом с помощью набора Total Protein FL-E (Vital Diagnostics, С.-Петербург, Россия). Окислительную модификацию белков оценивали по накоплению битирозина, продуктов неферментативного гликозилирования белков и флюоресценции остатков триптофана. Флюоресценцию битирозина измеряли при длине волны возбуждения 325 нм и длине волны испускания 416 нм, триптофанилов — при длине волны возбуждения 297 нм и длине волны испускания 336 нм [11, 12]. Содержание гликозилированных белков определяли флюориметрическим методом при длине волны возбуждения 370 нм и длине волны испускания 445 нм [13]. Уровень триптофана, битирозина и гликозилированных белков относили к количеству общего белка и выражали в относительных единицах.

Интенсивность флюоресценции НАДН изучали при длине волны возбуждения 340 нм, длине волны флюоресценции 460 нм [14].

Состояние липидного бислоя оценивали по интенсивности флюоресценции липофильного зонда ДФГ (Sigma Aldrich, США), который добавляли к суспензии до конечной концентрации 2 мкмоль. После 30-минутной инкубации при 37° регистрировали интенсивность флюоресценции при длине волны 430 нм, длина волны при возбуждении — 360 нм [15].

Изменения внеклеточного рН исследовали рН-метрически. При оценке внутриклеточного рН в качестве

зонда использовали флюоресцеин в конечной концентрации 5 мкг/мл. Значения внутриклеточного рН определяли по величине отношения интенсивностей флюоресценции проб при длинах волн 516 и 570 нм, длина волны возбуждения — 488 нм [16].

Измерение внеклеточного рН проводили на рН-метре м-150 (ф. «Антех», Гомель, Беларусь). Все остальные измерения выполняли на спектрофлюориметре «Флюорат-02 Панорама» (ф. «Люмэкс», С.-Петербург, Россия).

Данные, полученные в эксперименте, были обработаны статистически с помощью пакетов прикладных программ Excel, Statistica 6.0. Статистическая значимость различий средних определялась по критерию Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение. На первом этапе эксперимента было установлено, что излучение плазмы искрового разряда обладает бактерицидным действием и обработка даже в течение 60 с приводит к 100% ингибированию роста как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. Однако инактивация грамположительных бактерий выражена уже на коротких режимах воздействия (табл. 1), поэтому на втором этапе эксперимента представляли интерес оценка структурно-функциональных изменений прокариотических клеток под действием излучения плазмы и сравнительный анализ этих изменений в зависимости от типа бактериальной клеточной стенки.

Низкотемпературная плазма генерирует большое количество физически и химически активных факторов, которые при взаимодействии с бактериальной клеткой способны вызывать ее окислительные повреждения и, как следствие, гибель [17]. При низкой интенсивности свободно-радикальное окисление является одним из типов нормальных метаболических процессов [18]. В частности, цепное ПОЛ играет важную роль для нормального функционирования клеток. Образующиеся продукты ПОЛ выполняют в клетке определенные функции — регулируют процессы обновления биологических мембран, оказывают влияние на их проницаемость, регулируют состав липидов мембран [19]. В норме реакции образования и расходования перекисей сбалансированы и ПОЛ протекает на определенном стационарном уровне. При различных воздействиях такой баланс может изменяться и вызывать серьезные нарушения биологических мембран [18]. Эксперимент показал, что после воздействия излучением плазмы происходит снижение относительной концентрации молекулярных продуктов ПОЛ в суспензиях обоих штаммов бактери-

Таблица 1

Количество колониеобразующих единиц после воздействия излучением плазмы на исследуемые бактериальные штаммы

Тип клеток	Время воздействия, с								
	Контроль	5	10	15	30	60	120	300	600
<i>S. aureus</i>	86±5	86±4	60±3*	16±3*	17±3*	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	28±3	29±4	27±2	18±4*	7±2*	0	0	0	0

* — статистически значимая разница значений по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$.

Таблица 2

Концентрация молекулярных продуктов ПОЛ в суспензии клеток после воздействия излучением плазмы искрового разряда, отн. ед./мг липидов

Время воздействия, с	S. aureus			E. coli		
	ДК	ТК	ОШ	ДК	ТК	ОШ
Без воздействия	0,18±0,04	0,05±0,01	0,150±0,008	0,012±0,003	0,010±0,003	0,090±0,005
15	0,020±0,005*	0,010±0,002	0,100±0,004*	0,016±0,003	0,010±0,003	0,095±0,006
30	0,04±0,01*	0,010±0,005*	0,090±0,004*	0,0040±0,0015	0,008±0,002	0,060±0,006*
60	0,030±0,005*	0,010±0,002*	0,080±0,002*	0,0020±0,0004*	0,005±0,002	0,0300±0,0006*

* — статистически значимая разница значений по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$.

Таблица 3

Интенсивность флюоресценции битирозина, триптофана и гликозилированных белков в суспензии клеток после воздействия излучением плазмы искрового разряда, отн. ед./мг белка

Время воздействия, с	S. aureus			E. coli		
	Битирозин	Триптофан	Гликозилированные белки	Битирозин	Триптофан	Гликозилированные белки
Без воздействия	0,34±0,01	2,5±0,2	0,28±0,02	0,32±0,02	2,6±0,2	0,32±0,01
15	0,36±0,02	1,80±0,05*	0,28±0,01	0,280±0,005	3,90±0,06*	0,230±0,004*
30	0,300±0,006	1,60±0,02*	0,230±0,006	0,270±0,005	4,10±0,01*	0,220±0,006*
60	0,50±0,04*	2,7±0,2	0,50±0,04*	0,31±0,02	2,1±0,2	0,32±0,03

* — статистически значимая разница значений по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$.

альных клеток. Однако грамположительные бактерии реагируют на воздействие более резким уменьшением интенсивности ПОЛ, чем грамотрицательные бактерии (табл. 2). Можно предположить, что поддержание интенсивности процессов ПОЛ на уровне, необходимом для нормального функционирования клетки, у грамотрицательных бактерий осуществляется за счет липида А, входящего в состав липополисахарида клеточной стенки и служащего субстратом для окисления [20].

Функциональная активность белковых структур также является одним из важнейших факторов, участвующих в регуляции клеточной активности. Свободно-радикальное окисление белков приводит к образованию различных производных аминокислот, таких как модифицированные остатки триптофана, продукты неферментативного гликозилирования белков, битирозина, уровни содержания которых могут использоваться для оценки степени окислительной модификации белков (ОМБ) [11, 21]. Битирозин образуется в ходе одноэлектронного окисления тирозина, когда возникающий долгоживущий тирозил-радикал при взаимодействии с таким же радикалом формирует битирозиновые сшивки. Повышение уровня битирозина принято считать наиболее надежным маркером ОМБ. Окислительному действию кислородных радикалов подвергаются также аминокислотные остатки триптофана. Окисление приводит к его деградации, проявляющейся в снижении интенсивности флюоресценции. Повышение флюоресценции триптофана может быть обусловлено разворачиванием белковой молекулы, сопровождающимся переходом аминокислотных остатков из скрытой формы в «экспонированную» [22]. Со свободно-радикальными

процессами тесно связаны процессы гликозилирования белков. Продукты неферментативного гликозилирования образуются в результате присоединения молекулы глюкозы к аминокислоте белка и последующих превращений образовавшегося соединения, протекающих без участия ферментов [13]. Так, после воздействия излучением плазмы на суспензию грамположительных микроорганизмов уровень флюоресценции битирозина и гликозилированных белков возрастал к 60-й секунде обработки, а триптофана — снижался при воздействии в течение 15–30 с. У грамотрицательных бактерий изменений уровня флюоресценции битирозина не обнаружено, у триптофана он при воздействии в течение 15–30 с повышался, а у гликозилированных белков при тех же временных режимах снижался. Таким образом, при воздействии излучением плазмы наиболее выраженную окислительную модификацию претерпевают белки грамположительных бактерий (табл. 3).

Ответственными за общий заряд клеточной поверхности являются сиаловые кислоты, находящиеся на концах углеводных боковых цепей. При их отщеплении происходит изменение адгезивных свойств клетки и смена поверхностного заряда [23]. После воздействия излучением плазмы на суспензию грамположительных бактерий уровень сиаловых кислот во внеклеточной среде возрастает с увеличением времени воздействия, для грамотрицательных клеток статистически значимых изменений не выявлено (табл. 4).

Можно предположить, что отсутствие выраженной окислительной модификации белков и деградации поверхностных структур грамотрицательных микроорганизмов после воздействия излучением плазмы

Таблица 4

Концентрация сиаловых кислот во внеклеточной среде после воздействия излучением плазмы искрового разряда на суспензию клеток, ммоль/л

Время воздействия, с	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Без воздействия	0,28±0,08	0,64±0,08
15	0,52±0,16	0,60±0,08
30	0,52±0,12	0,60±0,08
60	0,56±0,04*	0,680±0,028

* — статистически значимая разница значений по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$.

обусловлено тем фактом, что активные формы, генерируемые плазмой, в первую очередь реагируют с липополисахаридом клеточной стенки.

Состояние липидного бислоя оценивали по интен-

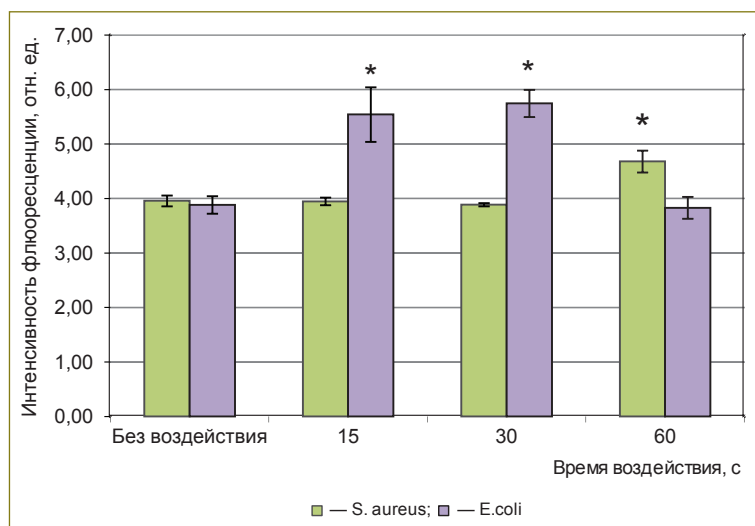


Рис. 1. Интенсивность флюоресценции зонда ДФГ, после воздействия излучением плазмы искрового разряда на суспензию клеток. * — статистически значимая разница значений по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$

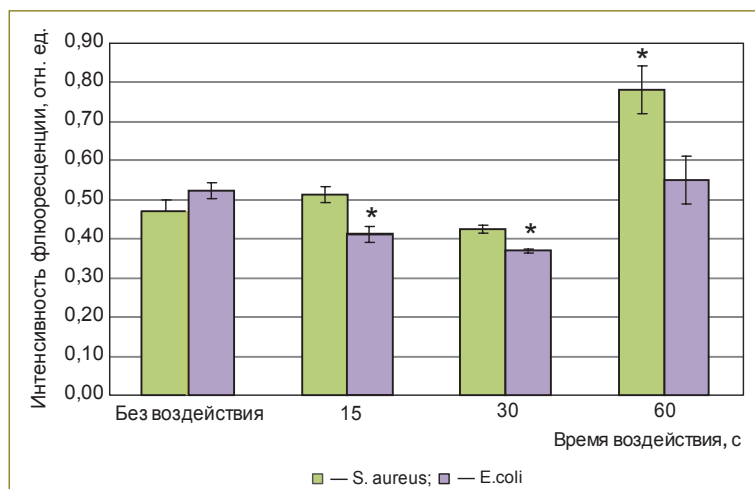


Рис. 2. Интенсивность флюоресценции НАДН в суспензии клеток после воздействия излучением плазмы искрового разряда. * — статистически значимая разница значений по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$

сивности флюоресценции встроенного в мембраны липофильного зонда ДФГ. ДФГ, являясь высокогидрофобным и располагаясь в глубине фосфобилипидного слоя, нековалентно связывается с наиболее гидрофобными участками. Интенсивность флюоресценции зонда свидетельствует о размерах и степени гидрофобности областей, занимаемых им: чем выше интенсивность флюоресценции, тем больше гидрофобность соответствующих областей [15]. Эксперимент показал, что после воздействия излучением плазмы на суспензию бактериальных клеток гидрофобность мембран грамположительных клеток повышается в течение 60 с, а грамотрицательных — в течение 15–30 с (рис. 1). Изменение гидрофобности мембраны может приводить к изменению заряда поверхности клетки и ее дестабилизации.

Флюоресцентный анализ пиридиновых нуклеотидов позволяет оценивать характер метаболических изменений в клетках. НАДН является кофактором более чем для 250 дегидрогеназ и играет ключевую роль в передаче электронов с донора на акцептор в электрон-транспортной цепи [23]. В основе метода флюоресцентного анализа пиридиновых нуклеотидов лежит влияние редокс-состояния этих молекул на их флюоресценцию — восстановленная форма НАД(Ф)Н имеет флюоресценцию, тогда как окисленная форма НАД(Ф) не флюоресцирует [14]. Таким образом, даже минимальные или краткосрочные изменения редокс-состояния этих молекул приводят к изменению их флюоресценции. Было установлено, что после воздействия излучением плазмы в течение 60 с на бактериальные штаммы в клетках преобладает окисленная форма НАД⁺; к моменту гибели клеток наблюдается переход в восстановленную форму (рис. 2). Можно предположить, что после воздействия излучения плазмы в бактериальных клетках происходит снижение эффективности работы дегидрогеназ и электрон-транспортной цепи.

По данным исследований [24, 25], воздействие излучением плазмы приводит к снижению pH в водных образцах. Однако несмотря на то, что бактериальные клетки способны выживать в достаточно широком диапазоне pH [26], изменение концентрации водородных ионов способно влиять на каталитическую активность внутриклеточных ферментативных процессов [27]. Полученные в нашей работе данные по изменению внеклеточного pH в суспензии бактериальных клеток после воздействия излучением плазмы (табл. 5) согласуются с литературными. Защелачивание внутриклеточной среды, вероятно, связано с адаптивными реакциями клеток в ответ на изменение pH вне клетки. Однако значительное снижение внеклеточного pH в течение короткого времени может приводить к разбалансировке метаболических процессов и влиять на жизнеспособность клетки [26].

Таблица 5

Уровень внеклеточного и внутриклеточного pH после воздействия излучением плазмы искрового разряда на суспензию клеток, отн. ед.

Время воздействия, с	S. aureus		E. coli	
	pH внеклеточный	pH внутриклеточный	pH внеклеточный	pH внутриклеточный
Без воздействия	6,43±0,10	6,3±0,2	5,8±0,1	5,80±0,08
15	6,17±0,08*	6,8±0,10*	5,36±0,06*	6,3±0,1*
30	5,18±0,10*	6,10±0,09	6,04±0,10	6,20±0,07
60	4,25±0,05*	5,80±0,06*	5,02±0,05*	6,20±0,09

* — статистически значимая разница по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$.

Заключение. Воздействие излучением плазмы искрового разряда в течение 60 с обладает стопроцентным бактерицидным действием в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Обработка излучением плазмы приводит к снижению концентрации продуктов перекисного окисления липидов, что может служить причиной нарушения нормального функционирования клетки и способствовать ее гибели. Деградация поверхностных структур и окислительная модификация белков в большей степени выражены у грампозитивных микроорганизмов. При действии излучением плазмы на суспензии бактериальных клеток возрастает гидрофобность мембран, в клетках преобладают пиридиновые нуклеотиды в окисленном состоянии, что может приводить к блокированию работы дегидрогеназ и электрон-транспортной цепи. В совокупности все эти изменения в метаболизме клеток и вызывают цитотоксический эффект.

Результаты данной работы показывают механизмы цитотоксического действия излучения плазмы искрового разряда и позволяют дать обоснованные рекомендации по использованию его в биологических и медицинских исследованиях.

Литература

- Kunhardt E.E. Generation of large volume atmospheric pressure non-equilibrium plasmas. *IEEE Trans Plasma Sci* 2000; 1: 189–200.
- Kogelschatz U. Filamentary, patterned and diffuse barrier discharges. *IEEE Trans Plasma Sci* 2002; 4: 1400–1408.
- Fridman G. Medical applications of floating electrode dielectric barrier discharge (FE-DBD). In: *First International Conference on Plasma Medicine (ICPM-1)*. Corpus Christi, Texas; 2007: 27–32.
- Laroussi M. Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art. *Plasma Process Polym* 2005; 5: 391–400.
- Laroussi M. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *IEEE Trans Plasma Sci* 1996; 3: 1188–1191.
- Ичеткина А.А., Трофимова С.В., Кряжев Д.В., Иванова И.П., Смирнов В.Ф. Влияние ультрафиолетового излучения и излучения плазмы импульсного искрового разряда на зародышевые структуры и мицелий микромицетов-деструкторов. *Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского* 2011; 2(2): 196–201.
- Kong M.G., Kroesen G., Morfill G. et al. Plasma medicine: an introductory review. *New Journal of Physics* 2009; 11: 35.
- Folch J., Lees M., Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 1957; 2: 497–509.
- Shenstone F.S. *Ultraviolet and visible spectroscopy of lipids*. New York; 1971.
- Fletcher D.L., Dillard C.J., Tappel A.Y. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological system and tissues. *Analyt Biochem* 1973; 52: 497–499.
- Davies K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem* 1987; 262: 9895–9901.
- Дубинина Е.Е., Гавровская С.В., Кузьмич Е.В. и др. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование в очищенных белках с использованием системы Фентона. *Биохимия* 2002; 67: 413–421.
- Munch G., Keis R., Wessels A. et al. Determination of advanced glycation end products in serum fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 669–677.
- Farabegoli G., Hellinga C., Heijnen J.J. et al. Study on the use of NADH fluorescence measurements for monitoring wastewater treatment systems. *Water Research* 2003; 37: 2732–2738.
- Batrakova E.A., Li S., Alakhov V.Y. et al. Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003; 2: 845–854.
- Туровецкий В.Б., Погосян С.И., Золотилин С.А., Карабай М.А. Влияние излучения He-Ne-лазера на функциональную активность и внутриклеточный pH перитонеальных фагоцитов мыши. *Биологические мембраны* 1992; 9(10–11): 1172–1174.
- Joshi S.G., Cooper M., Yost A. et al. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 3: 1053–1062.
- Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов и природные антиоксиданты. *Успехи химии* 1985; 9: 1540–1558.
- Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах. *Успехи современной биологии* 1993; 3: 286–296.
- Медицинская микробиология. Под ред. Покровского В.И. М: ГЭОТАР-Медиа; 2008; 768 с.
- Dean R.T., Fu S., Stocker R. et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324: 1–18.
- Степуро И.И., Островский Ю.М. Распределение и некоторые характеристики триптофана и тирозина в дрожжевой пируватдекарбоксилазе. *Биоорганическая химия* 1975; 6: 821–827.
- Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. *Основы биохимии*. М: Мир; 1981; 617 с.
- Tang Y.Z., Lu X.P., Laroussi M. et al. Sublethal and killing effects of atmospheric-pressure, nonthermal plasma on eukaryotic microalgae in aqueous media. *Plasma Process Polym* 2008; 5: 552–558.
- Иванова И.П., Трофимова С.В., Пискарев И.М. и др. Влияние активных форм кислорода низкотемпературной газоразрядной плазмы на резистентность мембран клеток. *Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского* 2011; 2(2): 190–195.
- Баснакьян И.А. Стресс у бактерии. М: Медицина; 2003; 136 с.
- Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. *Биологическая химия*. М: Медицина; 1990; 115 с.

References

1. Kunhardt E.E. Generation of large volume atmospheric pressure non-equilibrium plasmas. *IEEE Trans Plasma Sci* 2000; 1: 189–200.
2. Kogelschatz U. Filamentary, patterned, and diffuse barrier discharges. *IEEE Trans Plasma Sci* 2002; 4: 1400–1408.
3. Fridman G. Medical applications of floating electrode dielectric barrier discharge (FE-DBD). In: *First International Conference on Plasma Medicine (ICPM-1)*. Corpus Christi, Texas; 2007: 27–32.
4. Laroussi M. Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art. *Plasma Process Polym* 2005; 5: 391–400.
5. Laroussi M. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *IEEE Trans Plasma Sci* 1996; 3: 1188–1191.
6. Ichetkina A.A., Trofimova S.V., Kryazhev D.V., Ivanova I.P., Smirnov V.F. *Vestnik Nizhegorodskogo gosudarstvennogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo — Herald of Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky* 2011; 2(2): 196–201.
7. Kong M.G., Kroesen G., Morfill G. et al. Plasma medicine: an introductory review. *New Journal of Physics* 2009; 11: 35.
8. Folch J., Lees M., Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 1957; 2: 497–509.
9. Shenstone F.S. *Ultraviolet and visible spectroscopy of lipids*. New York; 1971.
10. Fletcher D.L., Dillard C.J., Tappel A.Y. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological system and tissues. *Analyt Biochem* 1973; 52: 497–499.
11. Davies K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem* 1987; 20: 9895–9901.
12. Dubinina E.E., Gavrovskaya S.V., Kuz'mich E.V. et al. *Biokhimiya — Biochemistry* 2002; 67: 413–421.
13. Munch G., Keis R., Wessels A. et al. Determination of advanced glycation end products in serum fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 669–677.
14. Farabegoli G., Hellinga C., Heijnen J.J. et al. Study on the use of NADH fluorescence measurements for monitoring wastewater treatment systems. *Water Research* 2003; 37: 2732–2738.
15. Batrakova E.A., Li S., Alakhov V.Y. et al. Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003; 2: 845–854.
16. Turovetskiy V.B., Pogosyan S.I., Zolotilin S.A., Karabayo M.A. *Biol membrany — Biological Membranes* 1992; 9(10–11): 1172–1174.
17. Joshi S.G., Cooper M., Yost A. et al. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 3: 1053–1062.
18. Burlakova E.B., Khrapova N.G. *Uspekhi khimii — Advance of Chemistry* 1985; 9: 1540–1558.
19. Zenkov N.K., Men'shchikova E.B. *Uspekhi sovremennoy biologii — Advance of modern biology* 1993; 3: 286–296.
20. *Meditinskaya mikrobiologiya* [Medical microbiology]. Pod red. Pokrovskogo V.I. [Pokrovskiy V.I. (editor)]. Moscow: GEOTAR-Media; 2008; 768 p.
21. Dean R.T., Fu S., Stocker R. et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324: 1–18.
22. Stepuro I.I., Ostrovskiy Yu.M. *Bioorganicheskaya khimiya — Bioorganic Chemistry* 1975; 6: 821–827.
23. Uayt A., Khendler F., Smit E., Khill R., Leman I. *Osnovy biokhimi* [Fundamentals of Biochemistry]. Moscow: Mir; 1981; 617 p.
24. Tang Y.Z., Lu X.P., Laroussi M. et al. Sublethal and killing effects of atmospheric-pressure, nonthermal plasma on eukaryotic microalgae in aqueous media. *Plasma Process Polym* 2008; 5: 552–558.
25. Ivanova I.P., Trofimova S.V., Piskarev I.M. et al. *Vestnik Nizhegorodskogo gosudarstvennogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo — Herald of Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky* 2011; 2(2): 190–195.
26. Basnak'yan I.A. *Stress u bakterii* [Stress in bacterium]. Moscow: Meditsina; 2003; 136 p.
27. Berezov T.T., Korovkin B.F. *Biologicheskaya khimiya* [Biological chemistry]. Moscow: Meditsina; 1990; 115 p.