

БИОЦИДНЫЙ ЭФФЕКТ НЕКОГЕРЕНТНОГО ИМПУЛЬСНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ИСКРОВОГО РАЗРЯДА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *in vitro* и *in vivo*

УДК 539.104:615.281
Поступила 30.03.2009 г.



И.П. Иванова*, д.б.н., зав. научной группой физико-химических воздействий НИИ прикладной и фундаментальной медицины;

М.И. Заславская, к.б.н., доцент кафедры микробиологии и иммунологии

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

English

Biocyclic effect of the spark discharge non-coherent impulse radiation in experiments *in vitro* and *in vivo*

I.P. Ivanova, BD, head of a physicochemical effect scientific group of the SRI of applied and fundamental medicine;

M.I. Zaslavskaya, c.b.s., assistant professor of a microbiology and immunology chair

Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod

The aim of work is investigation of the spark discharge plasma non-coherent impulse radiation (NCIR) use possibility as a factor capable of the microorganism growth and reproduction suppression in experiments *in vitro* and *in vivo*. The tasks of the bacteriostatic, bactericidal and fungicidal effect study, as well as the free-radical process level assessment in experiments *in vitro* and *in vivo* after the spark discharge plasma NCIR effect, were solving.

Materials and methods. A non-coherent impulse radiation in optical range of 180—800 nm was generated in a process of a highly energetic spark discharge initiation with a use of experimental device, created on a base of the ARSRIEPH (Sarov).

The microorganism cultures *S. epidermidis*, strain 51-1; *E. coli*, strain 18M and *C. albicans*, strain 601 from the NNSMA microbiology and immunology chair museum are used in work. The bacterial suspensions were irradiated in modes of 5 to 600s, there was inoculation of the corresponding selective media after treatment. The intact microorganism suspension was used as a control. An assessment of the free-radical reaction level after a NCIR treatment was made in the microorganism suspension with a method of induced chemiluminescence (Fe^{3+} and H_2O_2) at a biochemiluminometer BChL-6.

An assessment of fungicidal effect and free-radical homeostasis of animals after a non-coherent impulse radiation effect in experiments *in vivo* is made on 72 laboratory rat-males of the Wistar line with a mass of 200 ± 10 g by 12 samples in each series. All manipulations with animals were made with a use of ether anesthesia. The animals were divided into 6 series: the intact ones, effect of 100s, effect of 300s, contaminated *C. albicans* and effect of 100s, contaminated *C. albicans* and effect of 300s. The animals were infected perorally with a *C. albicans* suspension. The oral cavity irradiation with a NCIR has been made during 100 or 300s, in each 24 hours during 6 days after contamination. A concentration of *C. albicans* in the oral cavity was detected at the 7th day of contamination (in 24h after the last irradiation). An assessment of a free-radical homeostasis of animals after a NCIR treatment was made according to the blood plasma and erythrocyte free-radical reaction level, which was studied with a method of induced chemiluminescence.

Results. Both bacteriostatic and biocyclic effects of the spark discharge gas discharge plasma NCIR, as well as an increase of the free-radical process level in experiments *in vitro* and *in vivo* are established. It is revealed, that a NCIR of the gas discharge plasma possesses of 100% of a bactericidal and fungicidal effect at the bacterial suspension treatment during 200s in experiments *in vitro*. A bacteriostatic effect of a NCIR is demonstrated in experiments *in vivo*. The free-radical process level after a NCIR effect was increased in the cell suspension in experiments *in vitro*, that radiation in a microorganism activates the free-radical processes at the erythrocyte membranes in the studied modes.

Key words: microorganisms, plasma of the spark discharge, biocyclic effect.

* Иванова Ирина Павловна, тел. раб. 8(831) 465-42-81; e-mail: ivanova.ip@mail.ru

В последние годы ведутся исследования, направленные на использование стерилизующего эффекта газоразрядной плазмы. При генерации высоковольтного импульсного разряда в воздухе генерируются заряженные частицы, активные продукты плазмохимических реакций, некогерентное излучение оптического диапазона [1—3]. Эти факторы способны инициировать окислительно-восстановительные процессы в воде и окислять органические вещества [4, 5]. Кинетическая энергия частиц, ионов, квантов в плазме разряда существенно превышает энергию, необходимую для инактивации как вирусов, так и микроорганизмов [6]. Стерилизующий эффект инвазивного воздействия газоразрядной плазмы на небиологические объекты представлен в литературе [7]. Однако до настоящего времени недостаточно изучены бактерицидные свойства и биологические эффекты некогерентного светового импульсного излучения (НИИ) газоразрядной плазмы в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, когда воздействие осуществляется не плазмой разряда, а только излучением плазмы.

Цель работы — изучение возможности использования некогерентного импульсного излучения плазмы искрового разряда в качестве фактора, способного подавлять рост и размножение микроорганизмов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

В задачи исследования входило изучение бактериостатического, бактерицидного и фунгицидного эффектов, а также оценка уровня свободно-радикальных процессов в экспериментах *in vitro* и *in vivo* после воздействия некогерентным импульсным излучением плазмы искрового разряда.

Материалы и методы. НИИ в оптическом диапазоне 180—800 нм генерировалось в процессе инициации высокоэнергетического искрового разряда при помощи экспериментального устройства, созданного на базе ВНИИЭФ (г. Саров). Частота генерации импульсов составляла 1 Гц, длительность одного импульса — 10—50 мкс, энергия одного импульса — 5 Дж. Воздействие НИИ на биологические субстраты и ротовую полость животных осуществляли в режимах от 5 до 600 с. Расстояние от источника излучения до объекта составляло 1,5—2,0 см.

Бактериальные суспензии *S. epidermidis*, штамм 51-1; *E. coli*, штамм 18М и *C. albicans*, штамм 601 (полученные из музея кафедры микробиологии и иммунологии НижГМА) облучали в режимах от 5 до 600 с, предварительно клетки ресуспендировали в забуференном физиологическом растворе до концентрации $5 \cdot 10^4$ кл./мл. После обработки НИИ бактериальной взвеси объемом 2 мл отбирали 0,1 мл для посева на желточно-солевой агар (*S. epidermidis*), агар Эндо (*E. coli*), агар Сабуро (*C. albicans*). В качестве контроля использовали интактную взвесь микроорганизмов. Чашки с посевами термостатировали (37°C, 24 ч), после чего подсчитывали количество колоний на агаре. Каждая серия экспериментов *in vitro* проведена **пятикратно**.

Оценку уровня свободно-радикальных реакций

после обработки НИИ проводили во взвеси *S. albicans* методом индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) (Fe^{3+} и H_2O_2) на биохемилюминометре БХЛ-6 [8].

Для оценки фунгицидного эффекта НИИ и свободно-радикального гомеостаза животных после воздействия НИИ в экспериментах *in vivo* были проведены исследования на 72 лабораторных крысах-самцах линии Wistar массой 200 ± 10 г. Животные содержались в стационарных условиях вивария на стандартном рационе. Все манипуляции с животными проводили с применением эфирного наркоза. Животные были разбиты на следующие серии (по 12 штук): интактные — позитивный контроль, воздействие НИИ в течение 100 с, воздействие НИИ в течение 300 с, контаминированные *S. albicans* — негативный контроль, контаминированные *S. albicans* и воздействие НИИ в течение 100 с, контаминированные *S. albicans* и воздействие НИИ в течение 300 с.

Животных заражали перорально 0,2 мл суспензии *S. albicans*, штамм 601 в физиологическом растворе, концентрация микроорганизмов составляла $5 \cdot 10^4$ кл./мл [9, 10]. Выраженность фунгицидного эффекта НИИ (мазок из ротовой полости и посев на агар Сабуро) оценивали спустя 7 сут. Облучение ротовой полости НИИ проводили в течение 100 или 300 с через каждые 24 ч в течение 6 сут после заражения. Определяли концентрацию *S. albicans* в ротовой полости на 7-е сутки от момента заражения (через 24 ч после последнего облучения).

Оценку свободно-радикального гомеостаза животных после обработки НИИ проводили по уровню свободно-радикальных реакций плазмы крови и эритроцитов, который изучали методом индуцированной ХЛ [7].

Результаты исследования. Во всех экспериментах после воздействия НИИ на взвесь исследуемых культур микроорганизмов наблюдалось снижение количества колоний. При обработке в течение 25 с НИИ угнетало рост микроорганизмов, в течение 200 с и более — приводило к отсутствию колоний на чашках по сравнению с контрольной серией. Отмечена высокая эффективность бактерицидного и фунгицидного эффектов НИИ (табл. 1), а также зависимость эффекта от дозы облучения.

Исследование уровня ХЛ кандид показало значительное его увеличение после воздействия НИИ в режимах до 100 с (см. рисунок), что указывало на активацию свободно-радикальных процессов в клетках. Однако после обработки суспензии *S. albicans* в течение 600 с ХЛ была ниже, чем в контроле. Более низкий уровень ХЛ после увеличения времени экспозиции НИИ, возможно, связан с рекомбинационными процессами свободно-радикальных продуктов.

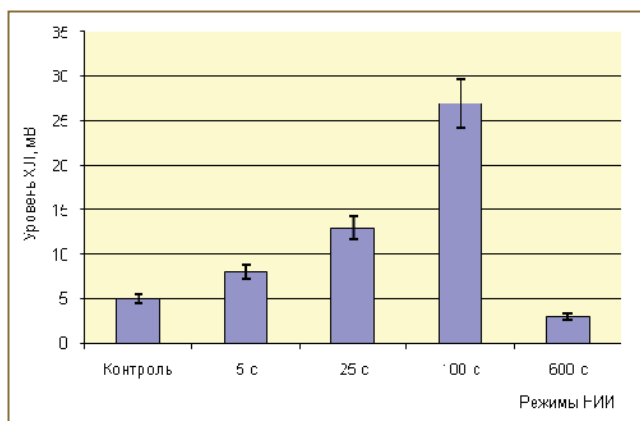
Возрастание уровня ХЛ после воздействия НИИ свидетельствует об активации свободно-радикальных процессов в клетках. А возрастание уровня свободных радикалов, как известно, ведет к образо-

Таблица 1

Эффект влияния НИИ оптического диапазона на культуры микроорганизмов

Продолжительность облучения НИИ, с	Количество КОЕ		
	<i>S. albicans</i> , штамм 601	<i>S. epidermidis</i> , штамм 51-1	<i>E. coli</i> , штамм 18M
Контроль (без воздействия)	368,2±45,2	595,1±93,6	486±78,3
600	0*	0*	0*
300	0*	0*	0*
200	0*	0*	0*
100	6,3±2,8*	0*	0*
25	122,4±37,3*	1,6±0,1*	2,3±0,7*

* — статистически значимые различия относительно контрольной серии, $p < 0,05$.



Уровень хемилуминесценции суспензии *S. albicans*, штамм 601 после обработки НИИ в различных режимах *in vitro*. Различия статистически значимы относительно контрольной серии, $p < 0,05$

ванию гидроперекисей, изменению гидрофобности липидного бислоя, перезарядке мембран, снижению активности мембраносвязанных ферментов, образованию гидрофильных пор и гибели клеток [11].

Таким образом, воздействие НИИ приводит к образованию радикальных продуктов и активных форм кислорода не только в воздухе и воде, но также и в суспензии клеток. Бактерицидный и фунгицидный эффекты НИИ связаны с возрастанием свободно-радикальных реакций, изменением стабильности липидного бислоя, что, в свою очередь, может приводить к нарушению метаболизма и торможению пролиферативной активности клеток.

В серии экспериментов *in vivo* исследовалась возможность применения НИИ в экспериментах на животных. Выраженность фунгицидного эффекта НИИ оценивали спустя 7 сут после серии воздействий на ротовую полость крыс, контаминированных *S. albicans*. Количество клеток кандид в материале, взятом из ротовой полости контроль-

ных (негативный контроль) животных на 7-е сутки после заражения составляло 427,8±228,6 КОЕ, а у животных после воздействия НИИ в режимах 100 и 300 с — 130,3±72,8 и 143,3±97,3 КОЕ соответственно ($p > 0,05$). После 6-кратного облучения ротовой полости НИИ не было обнаружено ожогов и гиперемии слизистой оболочки полости рта крыс.

Таким образом, 6-кратное облучение НИИ (в режимах 100 и 300 с) слизистой оболочки рта крыс, контаминированных *S. albicans*, способствовало снижению размножения *S. albicans* в ротовой полости. Довольно высокая остаточная обсемененность ротовой полости в данной экспериментальной модели (как у контрольных животных, так и у животных, подвергшихся облучению) могла быть следствием попадания кандид в нижние отделы респираторного тракта крыс (по результатам вскрытия животных), что могло служить постоянным источником эндогенного реинфицирования.

Оценку влияния исследуемых режимов НИИ на свободно-радикальный гомеостаз организма лабораторных животных проводили по уровню свободно-радикальных процессов в плазме крови и эритроцитах, который отражает свободно-радикальный гомеостаз организма в целом [12].

Установлено, что воздействие НИИ в режимах 100 и 300 с приводит к возрастанию уровня ХЛ эритроцитов по сравнению с контрольной серией (позитивный контроль). Уровень ХЛ эритроцитов крови крыс, контаминированных *S. albicans* (негативный контроль), был выше по сравнению с показателями интактных крыс (табл. 2).

Воздействие НИИ на животных, контаминированных *S. albicans*, приводило к снижению уровня ХЛ эритроцитов до уровня показателей в интактной группе, что могло быть связано с рекомбинацией избыточного количества радикальных продуктов, поскольку субстрат изначально обладал высоким свободно-радикальным статусом. В то же время уровень ХЛ плазмы крови практически не менялся

Таблица 2

Уровень хемилюминесценции плазмы крови и эритроцитов крыс (в мВ) на фоне воздействия НИИ (6-кратное облучение), М±m

	Режим облучения НИИ, с	ХЛ эритроцитов	ХЛ плазмы
Интактные животные	Без воздействия	10,5±3,8	79,40±12,49
	100	33,9±2,7*	86,47±15,94
	300	35,6±8,3*	95,28±6,03
Животные, контаминированные <i>S. albicans</i>	Без воздействия	16,5±1,5*	95,29±11,58
	100	8,9±2,2**	82,07±11,57
	300	15,0±3,5	78,09±14,6

* — статистически значимые различия относительно интактных животных без воздействия НИИ, $p < 0,05$;

** — статистически значимые различия относительно животных с оральным кандиозом без воздействия НИИ, $p < 0,05$.

как у контаминированных *S. albicans* животных, так и при воздействии НИИ, что свидетельствует о высокой активности антиоксидантных систем организма, которые поддерживают свободно-радикальный гомеостаз макроорганизма при стрессовых воздействиях, а также о том, что клеточные мембраны являются мишенями для НИИ. Воздействие НИИ в исследованных режимах (100 и 300 с) не вносило необратимого изменения в свободно-радикальный статус макроорганизма, о чем свидетельствовало сохранение стабильного уровня ХЛ плазмы крови после многократного воздействия высокоэнергетическим излучением.

Заключение. Некогерентное импульсное излучение эффективно подавляет рост грампозитивных, грамотрицательных и грибковых культур в экспериментах *in vitro* при воздействии в течение 200 с. Установлена высокая эффективность бактерицидного и фунгицидного эффектов НИИ, а также зависимость ее от дозы облучения. Фунгицидный эффект НИИ сохраняется также в системах *in vivo*, но в меньшей степени. В экспериментах *in vivo* НИИ проявляет бактериостатический эффект.

Воздействие НИИ приводит к образованию радикальных продуктов и активных форм кислорода не только в воздухе и воде, но также и в суспензии клеток, в макроорганизме. НИИ в изученных режимах активизирует свободно-радикальные реакции мембран эритроцитов.

Литература

1. *Базелян Э.М., Райзер Ю.П.* Искровой разряд. М: МФТИ; 1997; 317 с.
2. *Райзер Ю.П.* Физика газового разряда. М: Наука; 1992; 536 с.

3. *Пискарев И.М.* Выходы продуктов химических реакций под действием электрического заряда в среде воздуха, азота и кислорода. Химия высоких энергий 2000; 34(6): 475—476.
4. *Кутепов А.М., Захаров А.Г., Максимов А.И.* Химические процессы, инициируемые неравновесной плазмой в растворах. ТОХТ 2000; 34(1): 76—81.
5. *Пискарев И.М.* Окислительно-восстановительные процессы в воде, инициированные электрическим разрядом над ее поверхностью. Журнал общей химии 2001; 71(10) 1622—1623.
6. *Павловский А.И., Босамыкин В.С., Карелин В.И., Никольский В.С.* Электроразрядный ОКГ с иницированием в активном объеме. Квантовая электроника 1976; 9(3): 601—604.
7. *Schoenbach K.H.* The effect of pulsed electrical fields on biological cells. IEEE International Pulsed Power Conference Q-7803-4212; p. 85—90.
8. *Кузмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенников М.К.* Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободно-радикальных реакций в биологических субстратах. Межвузовский сборник биохимии и биофизики микроорганизмов. Горький; 1983; 179—183.
9. *Challacombe S.J.* Immunological aspects of oral candidiasis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994; 78(2): 202—210.
10. *Tono-Oka T., Ueno N., Matsumoto T.* Chemiluminescence of whole blood. A simple and rapid method for the estimation of phagocytic function of granulocytic and opsonic activity in whole blood. Clin Immunol Immunopatol 1983; 26(1): 66—75.
11. *Владимиров Ю.А.* Биологические мембраны и патология клетки. М: Наука; 1979; 47 с.
12. *Беличковский Б.Т.* Свободнорадикальное окисление как звено срочной и долговременной адаптации организма к факторам окружающей среды. Вестник РАМН 2001; 6: 45—52.