Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н., доцент И.П. Иванова

Нижний Новгород – 2022

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ДК – диеновые коньюгаты

ДФГ – 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен

ЛЗХЛ – люминолзависимая хемилюминисценция

МДА – малоновый диальдегид

МПО – миелопероксидаза

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

НСТ – нитросиний тетразолий

ОМБ – окислительная модификация белков

ОШ – основания Шиффа

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТГ – триацилглицериды

ТК – триеновые коньюгаты

ФАД – флавинадениндинуклеотид

ФИ – фагоцитарный индекс

ФЛ – фосфолипиды

ФХ – фосфатидилхолин

ФЧ – фагоцитарное число

ФЭ – фосфатидилэтаноламин

ХС – холестерин

ЭХС – эфиры холестерина

ОГЛАВЛЕНИЕ:

ВВЕДЕНИЕ 5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 11
1.1. Характеристика перитонеальных клеток, особенности строения и функции 11
1.2. Функциональное состояние макрофагов после воздействия различными электромагнитными факторами 17
1.3. Влияние УФ-излучения на макрофаги 20
1.4. Газоразрядная плазма. Факторы излучения плазмы 24
1.4.1. Биологические эффекты излучения плазмы 29
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 33
2.1. Объект исследования 33
2.2. Схема и основные этапы эксперимента 33
2.3. Характеристика применяемого излучения 35
2.4. Методы исследования 36
2.4.1. Выделение мононуклеарных перитонеальных клеток 36
2.4.2. Оценка цитотоксического эффекта 36
2.4.3. Определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста 37
2.4.4. Получение фазовых изображений клеток методом лазерной интерференционной микроскопии 38
2.4.5. Экстракция липидов 39
2.4.6. Анализ процентного содержания липидов и фосфолипидов 39
2.4.7. Анализ молекулярных продуктов окисления липидов 41
2.4.8. Определение окислительной модификации белков 43
2.4.9. Определение активности супероксиддисмутазы 45
2.4.10. Оценка структурного состояния цитоплазматической мембраны с использованием флуоресцентных зондов 46
2.4.11. Оценка концентрации сиаловых кислот на поверхности мембран перитонеальных клеток 48
2.4.12. Оценка адгезивных свойств перитонеальных клеток 48
2.4.13. Определение активности миелопероксидазы 49
2.4.14. Оценка функциональной активности перитонеальных клеток методом люминолзависимой хемилюминесценции 50
2.4.15. Оценка фагоцитарной активности клеток 51
2.4.16. Оценка кислородзависимого метаболизма клеток по реакции восстановления нитросинего тетразолия 51
2.4.17. Статистическая обработка данных 53
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 54
3.1. Влияние излучения плазмы искрового разряда и УФ-излучения на мононуклеарные перитонеальные клетки в эксперименте *in vitro* 54
3.1.1. Анализ цитотоксического действия излучения плазмы и УФ-излучения 54
3.1.2. Влияние излучения плазмы искрового разряда и УФ-излучения 59

на структурное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток
3.1.3. Влияние излучения плазмы искрового разряда и УФ-излучения на функциональное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток 82
3.2. Влияние излучения плазмы искрового разряда на мононуклеарные перитонеальные клетки в эксперименте *in vivo* 92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 102
ВЫВОДЫ 106
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 107

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

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

Основные задачи исследования

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 исследования

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 активирует 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 действе 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 мононуклеарных 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 регулироват, усиливать или снижать функциональную активность мононуклеарных 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 мононуклеарных перитонеальных клеток могут быть включены в учебные программы по биологии, физиологии, биохимии для студентов и аспирантов биомедицинских специальностей.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Кратковременные режимы воздействия (60 и 300 с) излучением плазмы искрового разряда *in vitro* вызывают активацию функционального состояния мононуклеарных 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 мононуклеарных 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).

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 источник (110 отечественных и 135 зарубежных). Работа содержит 17 рисунков и 8 таблиц.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика перитонеальных клеток, особенности строения и функции

Для поддержания резистентности организма огромное значение имеют клетки системы мононуклеарных фагоцитов, присутствующие во всех тканях организма, обладающие способностью к эндоцитозу, имеющие общее происхождение, а также схожие по морфологическим, цитохимическим и функциональным характеристикам. От полноценного функционирования иммунокомпетентных клеток во многом зависят интенсивность иммунного ответа и способность организма сохранять и поддерживать постоянство своего внутреннего состояния. Клетки иммунной системы – это универсальные индикаторы гомеостаза (Романюха, 2009; Lee et al., 2013; Phan et al., 2017; Piasecka et al., 2020).

Перитонеальная полость крыс содержит большое количество клеток иммунной системы, включая макрофаги (Zhang et al., 2008). Субпопуляционный состав перитонеальных клеток значительно отличается от периферической крови крыс и имеет свои видовые особенности. Популяция клеток перитонеальной полости является резидентной и состоит преимущественно из неактивированных клеток (Петренёв, 2017).

Макрофаги являются звеном иммунной системы и выполняют множество функций. Практически весь спектр метаболических реакций охватывают внутриклеточные процессы макрофагов и в полной мере отражают гомеостатическое состояние организма (Лямина, Малышев, 2014; Пинегин, Краснова, 2009). Макрофаги представляют собой гетерогенное семейство клеток фенотип и функции, которых зависят от микроокружения и могут меняться при определенных воздействиях. Они являются относительно долгоживущими, функционально активными клетками, имеют разнообразные поверхностные рецепторы и секреторные продукты (Пирутин и др., 2009; Lee et al., 2013).

Большинство мононуклеарных фагоцитов крысиных перитонеальных

клеток круглые или овальные, с расположенными в цитопламе эндоцитозными микровезикулами, а также первичными и вторичными лизосомами. В центре клетки расположено ядро округлой или эллипсовидной формы, под ядерной оболочной локализован гетерохроматин. Для перитонеальных макрофагов характерно, что в цитоплазме присутствует большое количество липидных телец, содержащих субстраты и ферменты (Сарбаева и др., 2016).

Структурная организация биомембран представлена липидным бислоем, белками-ферментами и рецепторами. Липидные компоненты мембран играют немаловажную роль в определении функциональной активности клеток. От содержания и соотношения различных липидных фракций зависят не только биофизические свойства клеточных мембран, но также возможности рецепторного аппарата, функционирование ионных каналов, работа ферментов и целостность клеток (Булыгин и др., 2001; Köberlin et al., 2016; Marelli-Berg et al., 2012). В отличие от липидов белки относятся к высокомолекулярным соединениям и обеспечивают выполнение мембранами специфических функций присущих каждому типу клеток. Белки вместе с липидами определяют структурную организацию мембран, выполняют сигнальную, регуляторную, транспортную, ферментативную функции. Согласно классическим представлениям белки являются функциональными элементами в мембране, а липиды структурными, однако сейчас ясно, что липиды также участвуют в сигнальных процессах через мембрану, обеспечивая «правильную» среду микродоменов, которые представляют собой области с различным распределением липидов в неоднородном бислое (Hammer et al., 2013). Еще один важный компонент мембраны – гликопротеины – белковые молекулы, содержащие углеводные цепочки. Гликопротеины, расположенные на поверхности клеток, ответственны за распознавание клеток и межклеточные контакты.

Миграция макрофагов в очаг повреждения – это важный этап в иммунном ответе. Причиной многих патологических состояний является

неправильная регуляция миграции (Мирошниченко и др., 2014). Адгезивность плазматической мембраны определяет способность клеток прикрепляться к какому-либо субстрату и отражает физическое и функциональное состояние мембраны (Барышева, Брюхин, 2008). Для улучшения контакта с субстратом клетки переходят к адгезированному состоянию, происходит образование филоподий, складок клеточного края, выпячивание цитоплазмы и актин-богатых точек контакта (Сарбаева и др., 2016; Ciobanasu et al., 2012; May, Machesky, 2001).

Для мононуклеарных перитонеальных клеток характерна экспрессия различных рецепторов: секретируемых, внутриклеточных и рецепторов, связанных с плазматической мембраной. Большинство из них необходимо для полноценного эндоцитоза и удаления опасных эндогенных и экзогеннных агентов. Другие рецепторы выполняют сигнальные функции, способствуют адгезии и миграции клеток, а также регулируют синтез провоспалительных медиаторов (Петренёв, 2017; Bowdish et al., 2009; Greaves, Gordon, 2004). Перитонеальные макрофаги обогащены молекулами адгезии, относящимися к подсемейству интегрина (CD11b/CD18), которые играют решающую роль в клеточно-опосредованных иммунных реакциях, опосредуя клеточные и клеточно-субстратные взаимодействия (Gjomarkaj et al., 1999). Также макрофаги экспрессируют специализированные рецепторы, работа которых обеспечивает тонкую регуляцию синтеза различных медиаторов и активацию факторов транскрипции (Сарбаева и др., 2016; Lee et al., 2013; Pixley, 2012). Взаимодействие рецепторов с соответствующими лигандами и молекулярными структурами активирует сигнальные каскады, которые индуцируют активацию и созревание макрофагов (Lee et al., 2013).

Большое количество рецепторов экспрессируемых мононуклеарными фагоцитами объясняет многообразие выполняемых ими функций (Lee et al., 2013; Taylor et al., 2005). Макрофаги являются клетками неспецифической защиты. Благодаря способности к фагоцитозу они выполняют свои функции. Кроме того, макрофаги являются профессиональными антиген-

презентирующими клетками и соответсенно участвуют в реакциях специфической защиты. Макрофаги секретируют биологически активные вещества, ферменты и цитокины, что позволяет им участвовать в регуляции иммунного ответа и поддержании гомеостаза (Олиферук, 2005; Сарбаева и др., 2016; Wu et al., 2013). Цитостатическая и цитотоксическая активность перитонеальных клеток связана с секрецией ряда цитокинов и активированных кислородных метаболитов (Петренёв, 2017; Реутов и др., 2016; Lee et al., 2013).

Фагоцитоз является неотъемлемой функцией макрофагов и имеет важное значение для защиты хозяина и инициирования врожденного и адаптивного иммунного ответа. Фагоцитоз – это одно из первых проявлений ответа организма на стимуляцию и включения защитных реакций (Pavlou et al., 2017). Активность и интенсивность фагоцитоза являются показателем функционального состояния клеток. Фагоцитарный процесс заключается в способности клеток поглощать чужеродный материал и с помощью специальных внутриклеточных ферментов уничтожать его. Активация фагоцитов сопровождается усилением кислородного метаболизма, что характеризуется резким увеличением потребления кислорода клеткой и образованием активных форм окислителей, например, пероксида водорода, супероксид аниона, синглетного кислорода, гидроксильного радикала, гипохлорида (Хаитов, 2011). Нарушение функции фагоцитоза может привести к недостаточности иммунного ответа, так как происходит дезорганизация процессов распознавания и продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов, процессинга бактериальных антигенов (Изикаев и др., 2011а; Изикаев и др., 2011б; Хаитов, 2011; Lee et al., 2013). Крысиные перитонеальные макрофаги экспрессируют несколько типов функциональных напряженных каналов K^+. Показано, что ионные каналы играют важную роль для активации макрофагов, изменения мембранных потенциалов являются одними из самых ранних обнаруживаемых событий при стимуляции фагоцитоза (Wu et al., 2013).

Наиболее характерной структурной особенностью макрофагов является выраженный лизосомальный аппарат, представленный большим количеством лизосом и фагосом, расположенных в цитоплазме клеток. Завершающая стадия фагоцитоза – это переваривание чужеродного агента или патологически измененного субстрата. Высокая активность ферментов, содержащихся в лизосомах необходима для осуществления этого функционального этапа. Именно набор гидролитических ферментов и состояние лизосомных мембран определяет функциональное состояние и активность клеток в целом. Дезорганизация активности лизосом может в итоге привести к снижению неспецифической резистентности и соответсвенно неспособности организма реагировать на разитие различных инфекций (Брюхин, Шаврина, 2013). Макрофаги секретируют лизоцим, пероксидазу, аргиназу, кислые протеазы, гидролазы, эстеразу, липазу, коллагеназу и другие ферменты.

Лизоцим отвечает за переваривание внеклеточных патогенов, а расширение клеточной мембраны обеспечивает их поглощение клетками через эндоцитоз (Dube et al., 2003). Пероксидаза – это фермент, который совместно с кислородными радикалами и перекисью водорода составляет эффекторное звено кислородзависимого аппарата бактерицидности фагоцитов. Однако перитонеальные макрофаги показывают низкий процент положительно-позитивных клеток при специфической реакции на пероксидазу (Мирошниченко и др., 2014). Миелопероксидаза – это лизосомальная каталаза, которая является основной бактерицидной системой клеток и обеспечивает в присутствии перекиси водорода окисление различных субстратов. Аргиназа расщепляет L-аргинин до орнитина и мочевины и может конкурировать за него с NO-синтазой, которая преобразует L-аргинин в оксид азота (NO) и цитруллин. Для классически активированных макрофагов характерна большая активность NO-синтазы, а для альтернативно активированных аргиназы (Лямина, Малышев, 2014). В результате активации индуцибельной NO-синтазы макрофаги синтезируют

NO, который играет регуляторную, сигнальную роль и обладает мощным окислительным и антимикробным потенциалом за счет образования активных форм азота (Реутов и др., 2016). Кроме внутриклеточной продукции ферментов фагоциты также секретируют ферменты в межклеточное пространство для осуществления бактерицидных функций, но при этом могут страдать и собственные ткани. Клетки секретируют целый ряд металлопротеаз для осуществления протеолиза и деградации внеклеточного матрикса, чтобы обеспечить хемотаксис и миграцию клеток в зону воспаления (Мирошниченко и др., 2014).

Ключевым фактором, определяющим функциональную активность перитонеальных клеток и центральной для многих аспектов реакции хозяина на инфекцию и воспаление, является НАДФН-оксидаза, трансмембранный белковый комплекс, активность которого регулируется уровнем внутриклеточного кальция, состоянием белков цитоскелета, иммунными комплексами, цитокинами и другими факторами (Babior, 1999; Nunes et al., 2013). НАДФН-оксидаза включает как мембрано-связанные, так и растворимые субъединицы, собранные в ответ на специфические сигналы для образования активного фермента. Активация НАДФН-оксидазы жестко регулируется и инициируется при связывании частиц, бактерий, грибов или растворимых воспалительных медиаторов с конкретными рецепторами на поверхности клеток фагоцитов (Nunes et al., 2013). Оксидаза профессиональных фагоцитов принадлежит к группе немитохондриальных энзимов, катализирующих образование супероксидного аниона в реакции одноэлектронного восстановления кислорода. При воздействиии стимулирующих агентов на плазматическую мембрану происходит активация мембранно-связанных дегидрогеназ, которые в свою очередь запускают систему активации окислительного метаболизма фагоцита, что приводит к образованию активных форм кислорода (АФК), и, следовательно, осуществляется активация фагоцитов (Маянский, 2007).

1.2. Функциональное состояние макрофагов после воздействия различными электромагнитными факторами

Важное место при анализе механизма действия различных факторов на клетки или организм является изучение их влияния на отдельные системы и функции. Макрофаги перитонеальной полости позволяют оценить состояние мембранных и надмембранных структур, активность ферментов, состояние генетического аппарата и выполнение различных функций при изучении действия различных факторов и моделировании патологических состояний на компоненты иммунной системы. Перитонеальные клетки хорошо поддаются изучению как *in vitro*, так и *in vivo* и являются основным источником для получения популяции резидентных тканевых макрофагов (Zhang et al., 2008). Макрофаги участвуют во многих физиологических и патофизиологических процессах, что позволяет рассматривать их как оптимальную модель для исследований. При этом макрофаги являются достаточно гетерогенными по своим свойствам клетками.

В настоящее время активно исследуются эффекты при применении различного электромагнитного излучения. Электромагнитный спектр в зависимости от длины волны разделяют на: гамма-излучение (менее 5 пм), рентгеновское (5 пм – 10 нм), ультрафиолетовое излучение (10 – 400 нм), видимое излучение (свет, до 700 нм), инфракрасное излучение (700 нм – 10 мм 0), радиоволны (включая сверхдлинные до 10 км). Спектр применения электромагнитных факторов довольно широк, но одним из основных направлений является изучение их влияния на состояние компонентов иммунной системы, как наиболее реактивной системы организма. Поиск различных физико-химических факторов, способных влиять на компоненты иммунной системы и регулировать их активность при инфекционных или неопластических процессах является актуальным. Электромагнитные излучения могут оказывать как положительное, так и отрицательное воздействие на живые организмы. При этом интенсивность реакции клеток зависит от концентрации или дозы какого-либо воздействия и во многом

связана с гетерогенностью клеточной популяции по устойчивости к этому воздействию.

Мишенью для любых фотоиндуцированных факторов в первую очередь является мембрана клетки. Усиление продукции активных форм кислорода и процессов перекисного окисления липидов продуцирует развитие оксидативного стресса и может приводить к гибели клеток (Пирутин и др., 2002; Часовских и др., 2009; Kudryashov et al., 2004). При этом снижение температуры инкубации и повышение pH усиливает повреждающее действие, а повышение температуры в интервале 30 – 37°C и снижение pH уменьшает эффект повреждения (Пирутин и др., 2004).

Облучение участка кожи полихроматическим видимым + инфракрасным поляризованным светом в терапевтической дозе сопровождается немедленным изменением мембранного фенотипа мононуклеаров всей циркулирующей крови. Обнаружен иммуномодулирующий эффект, что выражается в изменении содержания цитокинов, количества иммуноглобулинов G, A и M, циркулирующих иммунных комплексов, активности фагоцитоза, секреции бактерицидных белков, причем эти эффекты развиваются в обратной зависимости от исходных показателей (Zhevago et. al., 2004).

Облучение перитонеальных макрофагов *in vitro* электромагнитным излучением на частотах молекулярных спектров оксида азота длительностью 10 и 30 минут увеличивало фагоцитарную активность, удлинение времени воздействия до 60 минут оказывало цитотоксическое действие на клетки, что связывают с повышением синтеза молекул NO (Райкова и др., 2009).

В эксперименте на альвеолярных макрофагах показано, что рентгеновское излучение вызывает повышение активности протеазы, что может привести к ее освобождению из клеток и выход в ткани. Электромагнитное излучение крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ) и слабое переменное магнитное поле сверхнизкой частоты напротив способствуют повышению защитного потенциала макрофагов, что выражается в

увеличении цитохимического показателя содержания протеазы. Также установлено, что эффект комбинированного действия факторов отличается при их изолированном действии. ЭМИ КВЧ ослабляет воздействие рентгеновского излучения на протеазную активность макрофагов (Ярмолюк и др., 2008).

В экспериментальных исследованиях и в клинической практике широко применяется лазерное излучение различного спектрального состава. Известно, что лазерное облучение низкого уровня может влиять на реакции гиперчувствительности и воспалительные процессы, усиливать процессы адгезии и активировать фагоцитарные реакции (Рудик и др., 2002; Yu et al., 1997; Dube et al., 2003). Под действием облучения He-Ne-лазером в цитоплазме клеток образуются небольшие количества АФК, увеличивается проницаемость клеточных мембран к ионам кальция, изменяется активность лизоцима, катепсина и кислой фосфатазы, происходит высвобождение факторов роста, и увеличение фагоцитарной активности, индуцируется прайминг клеток (Клебанов, 2003; Dube et al., 2003; Klebanov et al., 1998; Young et al., 1990). Предполагается, что He-Ne-лазер из-за стимуляции митохондриальной активности индуцирует увеличение внутриклеточной концентрации НАДФН и приводит к метаболической сигнализации для макрофагов (Рудик и др., 2002; Rosenspire et al., 2000; Dube et al., 2003). Кроме того, отмечается изменение текучести мембран, «распластывание» клеток и увеличение их размеров (Dube et al., 2003). Вероятно, в основе активации фагоцитов лежит взаимодействие стимулятор – клетка, которое осуществляется либо непосредственно через рецепторный аппарат клетки, либо с помощью неспецифической реакции за счет взаимодействия с плазматической мембраной или цитозольными компонентами клеток. А сам процесс активации включает две стадии: взаимодействие клеток со стимуляторами и передача сигнала для формирования общеклеточного ответа (Клебанов, Владимиров, 1999).

1.3. Влияние УФ-излучения на макрофаги

В жизнедеятельности всех организмов УФ-излучение играет, несомненно, важную роль и часто используется для моделирования фотохимических реакций в различных медико-биологических исследованиях. Кроме того, УФ-излучение нашло широкое применение в различных лечебных физиотерапевтических процедурах. С постепенным изучением оптического излучения различного спектрального диапазона при различных патологических состояниях, влияния его на организм в целом и на отдельные клетки в иммунологии сформировалось целое направление – фотоиммунология (Тюнина, 2015; Duthie et al., 1999). Все фотобиологические процессы начинаются с поглощения кванта света биологически важной молекулой и заканчиваются какой-либо физиологической реакцией. Эффекты УФ-излучения на иммунную систему человека чрезвычайно сложны и характеризуют серию событий, инициированных облучением.

УФ-излучение – это излучение электромагнитной природы. Спектр УФ-излучения занимает диапазон от 10 до 400 нм и расположен между рентгеновскими лучами и видимым светом. При обсуждении механизма действия УФ-излучения считается, что первичной реакцией является поглощение энергии УФ-фотона молекулой и ее переход в возбужденное состояние. При этом особенность УФ-излучения заключается в том, что УФ-лучи разной длины волны поглощаются различными биологическими молекулами, которые отличаются как по химическому составу, так и конформации (Биофизика, 2013). Установлено, что УФ-фотоны длина волны которых меньше 260 нм способствуют образованию в воде радикалов, $HO^{\bullet}_2$, кислотных остатков NO^{-}_2 и NO^{-}_3, ионов аммония (Пискарев и др., 2013а; Пискарев и др., 2013б). УФ-излучение обладает небольшой проникающей способностью, что связано с интенсивным поглощением УФ-света различными биомолекулами и малой энергией квантов излучения (Биофизика, 2013; Тюнина, 2015). При воздействии на многоклеточные организмы или ткани область первичных фотохимических эффектов

ограничивается поврхностными слоями клеток: УФ-излучение в диапазоне 315 – 400 нм проникает в ткани примерно на 1 мм, а УФ-излучение в диапазоне 280 – 315 нм примерно на 0,5 мм (Биофизика, 2013).

УФ-излучение может как активировать (Салмин и др., 2014; Артюхов В.Г. и др., 2013; Norval et al., 2008; Oh et al., 2004; Sheehan et al., 2002), так и вызвать иммунное подавление как врожденных, так и адаптивных иммунологических параметров (Бехало и др., 2009; Clydesdale et al., 2001; Kasahara et al., 2001). В ряде исследований показано снижение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов и уменьшение жизнеспособности (Jeevan et al., 1995; McLoone, Norval, 2005). Механизм УФ-индуцированного подавления фагоцитоза перитонеальных макрофагов до конца не изучен. Показано, что облучение мышиных перитонеальных макрофагов *in vitro* с помощью УФ-излучения в дозе 50 мДж/см^2 вызывает продуцирование NO и цитокинов, участвующих в воспалении, а также влияет на регуляцию поверхностных рецепторов (Sethi, Sodhi, 2004; McLoone, Norval, 2005). Также установлено, что pH инкубационной среды влияет на количество поврежденных клеток, их структурно-функциональное состояние и устойчивость к повреждающим факторам после УФ-излучения. При уменьшении до 6,3 pH среды инкубации происходит существенное снижению числа поврежденных излучением клеток. При повышении pH среды до 8,4 установлено увеличение числа поврежденных клеток в популяции макрофагов после УФ-излучения (Пирутин и др., 2004; Пирутин и др., 2009). На чувствительность мембран перитонеальных макрофагов мышей к УФ-излучению также оказывает влияние концентрация Ca^{2+}. Показано, что снижение во внеклеточной среде концентрации Ca^{2+} приводит к снижению УФ-индуцированного повреждения клеточных мембран, а повышение концентрации как внутри, так и вне клеток сопровождается повышением количества макрофагов с поврежденной мембраной. Вероятно, с изменением электрической стабильности липидного матрикса под влиянием собственного

мембранного потенциала связано изменение фоточувствительности мембран (Пирутин и др., 2011).

К основным механизмам УФ-индуцированного клеточного повреждения можно отнести, во-первых, поглощение УФ-энергии клеточными макромолекулами, а во-вторых, изменение ДНК, белков и липидов, вызванных индуцированным нарушением клеточного окислительно-восстановительного состояния (Kong et al., 2009).

Изменения цитоплазматической мембраны – первые изменения инициированные УФ-излучением (Пирутин и др., 2002). Происходит нарушение барьерной функции мембраны, что связано с фотоокислением липидов и изменениями в белковых молекулах. К основным хромофорам белков относятся остатки серосодержащих и ароматических аминокислот: триптофана, тирозина и фенилаланина. Именно эти аминокислоты отвечают за функционально активное поглощение квантов света макромолекулами белков. Фотоионизация – это первичная фотореакця ароматических аминокислот в белке, в результате чего происходит, отрыв электрона от молекулы аминокислоты и образуются катион-радикал и сольватированный электрон (Биофизика, 2013; Рощупкин и др., 2000; Clydesdale et al., 2001; Duthie et al., 1999). Поглощение квантов УФ-света (254 нм) цистином провоцирует фотолиз цистина и приводит к разрыву связи -S-S- и образованию радикалов. В результате этого может происходить фотоинактивация белков и, следовательно, нарушение ферментативной, транспортной, регуляторной и других функций (Тюнина, 2015). УФ-излучение в определенных дозах может индуцировать повышение функциональной активности некоторых белков, в частности супероксиддисмутазы (Артюхов и др., 2009).

Один из факторов, вызывающих иммунную супрессию под влиянием УФ-излучения – повреждение ДНК. Происходит образование фотодимеров тимина, урацила, цитозина, пиримидоновых фотопродуктов, различных сшивок ДНК, разрывов сахарофосфатного остова нуклеиновых кислот. Для

осуществления репарации после УФ-облучения необходимо замедление жизненного цикла клетки, что возможно в результате активации MAP-киназы p38. Кроме повреждения ДНК под действием УФ-излучения продуцируется ряд цитокинов, которые способствуют подавлению иммунного ответа (Артюхов и др., 2011; Бехало и др., 2009; Kong et al., 2009; Kwon, Jin, 2015).

Мишенями для действия УФ-излучения с длиной волны около 340 нм являются коферменты НАДН и НАДФН. Участие в окислительно-восстановительных реакциях основная роль этих коферментов в клетке. Соответственно, УФ-излучение может приводить к изменениям в интенсивности и скорости протекания окислительно-восстановительных реакций в клетке. Исследование НАДФН-оксидазы макрофагов как модельной системы позволяет оценить фотобиологические эффекты после действия импульсного УФ-излучения на коферменты НАДН и НАДФН (Jiang et al., 2006). Именно НАДФН-оксидаза вносит наибольший вклад в продукцию супероксидного анион-радикала и участвует в «дыхательном взрыве» при фагоцитозе (Nunes et al., 2013). Установлено, что низкие дозы импульсного УФ-излучения оказывают стимулирующее действие на функциональное состояние перитонеальных макрофагов, а высокие дозы оказывают ингибирующее действие. Предполагается, что мембрано-связанная НАДФН-оксидаза катализирует перенос протона и электронов тем самым усиливая фотохимический механизм, который лежит в основе этих эффектов (Салмин и др., 2014).

УФ-излучение обладает ограниченной проникающей способностью и не может непосредственно облучать отдаленные лимфоидные органы, поэтому его действие при воздействии *in vivo* косвенно. Основные эффекты после воздействия УФ-излучением связаны с изменением сигнальных механизмов, в результате чего происходит изменение ряда внутриклеточных процессов, таких как: синтез белков (в том числе регуляция транскрипции активными формами кислорода), выработка цитокинов, запуск программируемой или непрограммируемой клеточной гибели. При этом

изучается влияние УФ-облучения на метаболизм клеток, на концентрацию кальция в клетке и кальций-зависимые регуляторные пути, а также рецепторный профиль (Артюхов, Башарина, 2021; Duthie et al., 1999; McLoone, Norval, 2005; Norval et al., 2008; Schmitt, Ullrich, 2000).

В последнее время в клинике используется метод аутотрансфузии УФ-облученной крови, который позволяет корректировать нарушения в работе иммунной системы больных. При этом установлены бактерицидный и противовоспалительный эффекты, иммунокорригирующий и иммуностимулирующий (Тюнина, 2015). Кроме того, установлены эффекты фотоадаптации у грызунов при исследованиях *in vivo* и использовании повторных субэритемных УФ-облучений. Такая фотоадаптация связана с повышением способности восстанавливать повреждение ДНК и с активацией работы защитных ферментов (Oh et al., 2004; Sheehan et al., 2002).

Несмотря на то, что изучению действия УФ-излучения на клетки и организм в целом посвящено достаточное количество работ, но исследований, посвященных влиянию УФ-излучения на мононуклеарные перитонеальные клетки не так много и данные, носят разрозненный характер после одного или ограниченного числа УФ-доз и преобладают исследования УФ-излучения В-диапазона (Салмин и др., 2014; McLoone, Norval, 2005; Norval et al., 2008). При этом до конца не изучены механизмы активирующего действия УФ-излучения на компоненты иммунной системы.

1.4. Газоразрядная плазма. Факторы излучения плазмы

Газоразрядная плазма представляет собой ионизированный газ, состоящий из электронов, положительных и отрицательных ионов, радикалов, нейтронных атомов и ультрафиолетовых фотонов (Attri et al., 2015; Chen et al., 2017). Один из наиболее универсальных и доступных методов генерирования плазмы является электрический разряд (Пискарев и др., 2013б). Импульсный искровой разряд – это такой газовый разряд, который возникает в сильно неоднородных электрических полях. Для генерации искрового разряда в лабораторных исследованиях инициируют

электрический пробой, который возникает в результате приложения к непроводящему веществу сильного электромагнитного поля в результате чего данное вещество превращается в проводник. Когда ионизация в веществе достигает значительной величины, то между электродами возникает видимая световая вспышка (Базелян, Райзер, 1997). Энергетический выход излучения пропорционален вложенной в канал электрической энергии. Такие характеристики как нтенсивность волны, мощность светового и звукового импульс зависят от энергии вводимой в канал разряда и скорости самого ввода (Амиров, и др., 1991). Высокоэнергетические разряды формируются за счет того, что энергии электрического разряда и электромагнитного поля преобразуются в потоки частиц, имеющих энергию от 0,5 до 100 Дж. Важнейшим механизмом рождения зарядов в газовых разрядах, является ионизация. Частота ионизации – главная характеристика скорости процесса. Она пропорциональна плотности газа и определяется энергетическим спектром электронов. Высокотемпературная сильно ионизированная плазма образуется при прохождении между электродами импульса тока разряда. Сильно ионизованной называют такую плазму, в которой ионизация высока настолько, что в ней преобладает столкновение электронов с ионами и друг с другом, а не с нейтральными молекулами (Базелян, Райзер, 1997).

Процессы химических преобразований с различными атомами, молекулами, активными радикалами и ионами в воздухе происходят при формировании и развитии электрического заряда (Nicole et al., 1990). В газовой фазе в результате действия электрического разряда происходит генерация активных частиц ($HO^{\bullet}_2$, $O^{\bullet}$, остатков NO^{-}_2 и NO^{-}_3, NH_4^{+}), взаимодействие которых определяет все дальнейшие химические превращения, как в биологических субстратах, так и в жидких средах. Все реакции, происходящие под действием электрического разряда, реализуются в две стадии. В процессе первой стадии образуются химически активные частицы, и эти частицы реагируют между собой, в процессе второй стадии

активные частицы реагируют с другими веществами (Пискарев и др., 2016). Таким образом, образующиеся при генерации разрядов активные частицы расходуются либо в реакциях с другими веществами, либо гибнут при взаимодействии между собой.

В последнее время неравновесная (холодная) атмосферная плазма привлекает все больше внимания исследователей из-за ее огромного потенциала для воздействия на биологические процессы (Chen et al., 2017; Flynn et al., 2016; Keidar et al., 2011; Kong et al., 2009; Yousfi et al., 2014). Плазменные технологии активно применяются в различных областях, таких как восстановление окружающей среды и борьба с загрязнением, обработке материалов, электрохимии, здравоохранении, биомедицине, включая дезинфекцию, лечение ран, контроль воспаления, свертывание крови, терапию рака и регенеративную медицину (Choi et al., 2016; Daeschlein et al., 2015; Jung et al., 2012; Laroussi et al., 2017; Lu et al., 2016; Schmidt et al., 2013; Robert et al., 2013).

Для излучения высокой энергии характерно специфическое распределение, которое определяет особенность его действия в тканях. Во-первых, увеличение относительной глубины проникновения, а, во-вторых, уменьшение поверхностных и общих повреждений. Совместное действие нескольких активных компонентов плазмы определяет механизмы действия плазмы на биологические объекты. В первую очередь это генерируемое излучение, в частности УФ-диапазона, а также активные частицы, в том числе свободные радикалы и молекулы основного состояния, например, озон и пероксиды водорода (Пискарев и др., 2016; Lu et al., 2016; Friedman et al., 2008; Dobrynin et al., 2009).

В процессе метаболической активности клеток в живых организмах реакции с образованием активных частиц и радикалов протекают постоянно. В результате чего происходит образование пероксидных радикалов, супероксидного анион-радикала, синглетного кислорода, гидроксильного радикала (Кулинский, 1999). В антибактериальной защите организма

фундаментальную роль играют активные частицы, продуцируемые клетками иммунной системы: макрофагами и нейтрофилами (MacMicking et al., 1997). Кроме того, активные частицы участвуют в регуляции различных клеточных функций, сигнальных путей, могут выступать в качестве вторичных мессенджеров (Dai et al., 2013; Droge, 2002; Kosenko et al., 1997; Skowronska, Albrecht, 2013; Thannickal, Fanburg, 2000). Для АФК характерны следующие физиологические эффекты: цитотоксическое действие в составе фагоцитов, регуляция пролиферации, индукция транскрипции отдельных генов (Чекнев, 1999). В клетках под влиянием АФК накапливаются вторичные посредники, таких как цАМФ и цГМФ, которые в свою очередь вызывают увеличение ионов Ca^{2+} в цитозоле клеток и стимулируют фосфорилирование белков тем самым выполняя регуляторную функцию (Кулинский, 1999).

Основные реактивные молекулы, создаваемые в плазме атмосферного давления, инициируются реакциями диссоциации электронов плазмы с атмосферным кислородом и азотом. В результате излучение плазмы включает в себя активные формы кислорода и азота, свободные радикалы, которые затем транспортируются от точки генерации до точки взаимодействия с материалами, средой, живыми клетками или тканями, которые подвергаются воздействию (Laroussi et al., 2017; Lu et al., 2016). Сразу после воздействия излучением пазмы в составе продуктов, накапливающихся в воде, идентифицированы ионы NO_2^- и конечный продукт NO_3^-, при этом данные продукты определяются в воде и на третьи сутки после обработки (Пискарев и др., 2017).

Известно, что низкие дозы активных форм кислорода и азота индуцируют клеточную пролиферацию, а высокие дозы могут повредить белки, липиды, ДНК и индуцировать апоптоз (Реутов и др., 2016; Friedman et al., 2008; Kong et al., 2009; Leduc et al., 2010). Мембрана является первой мишенью для реакционноспособных частиц, созданных плазмой. Одним из наблюдаемых явлений на мембранах, вызванных плазменной обработкой, является так называемое «плазма-порирование». Плазма способна

индуцировать временные поры или повреждения мембраны, инициированные перекисным окислением липидов, а поперечные связи боковых цепей жирных кислот приводят к образованию переходных пор (Hammer et al., 2013).

Наблюдается снижение жизнеспособности клеток, что может быть связано с нарушением структуры ДНК в условиях экзогенной генерации гидроксильного радикала, а также супероксидного анион радикала. Супероксидный радикал инициирует процессы перекисного окисления в мембране и может вызывать деполяризацию кислых полисахаридов. Гидроксильный радикал, продуцируемый плазмой, может повреждать нуклеиновые кислоты, и тем самым оказывать мутационное и летальное действие на клетки, инактивировать ферменты, вызывать расщепление ацильных цепей ненасыщенных жирных кислот (Laroussi et al., 2017). Другим побочным продуктом применения плазмы является перекись водорода (H_2O_2). Перекись водорода обладает сильными окислительными свойствами, которые влияют на пероксидные ионы, липиды, белки и ДНК. В присутствии нитритов H_2O_2 может реагировать с образованием пероксинитрита (Пискарев и др., 2014). Взаимодействие пероксинитрита с биологическими клетками приводит к активации каспазы с последующим апоптозом или к окислению липидов, нитрованию или окислению белка, что может привести к некрозу (Laroussi et al., 2017). В целом действие активных частиц на клетки идет двумя путями: изменение внутриклеточного окислительно-восстановительного состояния и окислительная модификация макромолекул, а интенсивность воздействия зависит от концентрации.

Основной проблемой для активного использования и применения плазменных устройств является неконтролируемая продукция активных частиц и их взаимодействие между собой, что добавляет сложности в регулировании воздействия на клетки и организм, поэтому на сегодняшний момент актуальна разработка плазменных устройств, создающих фармакологически приемлемые дозы активных частиц (Kong et al., 2009).

Активные частицы плазмы контактируют с поверхностью и не проникают вглубь объекта. Излучение плазмы обладает повышенной проникающей способностью и может создавать внутри повышенную концентрацию активных частиц (Пискарев и др., 2016). Кроме непосредственного образования активных частиц во время генерации плазмы, УФ-излучение, как один из действующих факторов индуцирует высвобождение внутриклеточных активных частиц, что, в свою очередь, вызывает окислительную деградацию липидов, белков (Michnik et al., 2008; Ogura et al., 1994) и повреждение ДНК (Durant et al., 2006; Kong et al., 2009). Важно минимизировать негативные реакции, вызываемые плазмой, но при этом положительные эффекты должны быть максимальными.

1.4.1. Биологические эффекты излучения плазмы

Первоначально применение плазмы заключалось в обработке различных материалов, но именно использование плазмы в биологии, медицине и экологии в последнее время приобрело значительный интерес (Иванова и др., 2013; Laroussi et al., 2017; Dobrynin et al., 2011). В последнее время появилось много работ посвященных воздействию излучения неравновестной плазмы на живые системы.

Известно, что холодная плазма обладает эффективным бактерицидным действием (Иванова, Заславская, 2009; Hammer et al., 2013; Laroussi et al., 2017; Lu et al., 2016). В ряде работ было показан стопроцентный бактерицидный эффект излучения плазмы разряда в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, а при определенных режимах также обладает фунгицидным эффектом. В экспериментах *in vivo* было показано, что происходит подавление орального кандидоза у крыс (Заславская, Иванова,2005). Изучалось влияние излучения на споры и мицелий микромицетов-деструкторов. Установлено, что не происходит прорастания мицелия после обработки зародышевых структур излучением плазмы, но спороцидный эффект УФ-излучения оказывается менее выраженным (Ичеткина и др., 2011). Окислительная модификация

белков, деградация рибосом и нуклеоида – основные механизмы цитотоксического эффекта излучения плазмы (Иванова и др., 2013; Иванова и др., 2014).

Способность холодной плазмы инактивировать патогенные организмы позволили применять излучение плазмы искрового разряда в качестве стерилизующего агента при очистке воды (Пискарев и др., 2013б), а также в экспериментах по плазменной обработке ран, для улучшения их заживления и с целью снижения микробной нагрузки (Martines et al., 2009; Laroussi et al., 2017; Lu et al., 2016). В работе (Dobrynin et al., 2011) было подтверждена бактериальная инактивация золотистого стафилококка в области раны в экспериментах *in vivo*, что позволяет сократить время заживления ран.

В ряде исследований изучено влияние плазмы на вязкость крови, так как известно, что повышенная вязкость крови повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Использование нетеплового диэлектрического барьерного разряда вызывает образование коагулированных частиц из белков плазмы и молекул липидов плазмы крови, которые можно удалить путем фильтрации уменьшив тем самым вязкость крови (Jung et al., 2012). Показано, что низкотемпературная плазма инициирует свертывание крови, вызывая агрегацию белка. Вероятно, плазма способна менять сложную третичную структуру белка, при этом, не расщепляя пептидную связь при определенном времени воздействия. Также показано, что в результате воздействия излучением плазмы изменяется баланс ионов в плазме крови крыс. При удлинении времени действия излучения плазмы установлено повреждение мембран эритроцитов в экспериментах *in vitro* (Астафьева, Иванова, 2017; Иванова и др., 2011) за счет активации процессов окислительной модификации белков и увеличении восстановленного НАДФН и окисленного ФАД (Иванова и др., 2014).

О наличии дозозависимого воздействия плазмы свидетельствуют и эксперименты, проведенные *in vitro* с фибробластами, эндотелиальными, эпителиальными и гладкомышечными клетками. Показано, что клетки после

короткого времени воздействия плазмой сохраняют жизнеспособность, способность к адгезии к пластику и к делению. Но воздействие гелиевой плазмой при кратковременных режимах вызывает временную проницаемость мембраны, нарушение межклеточного взаимодействия и ингибирование миграции клеток (Shashurin et al., 2008; Stoffels et al., 2008). Длительное время воздействия или лечение плазмой с большей интенсивностью индуцировали либо апоптоз клеток (запрограммированная гибель клеток), либо некроз (случайная гибель клеток) (Kieft et al., 2006; Kong et al., 2009).

Открытие апоптотической способности низкотемпературной плазмы привлекает внимание исследователей для применения плазменных источников в качестве противоопухолевой терапии. Показано, что нетепловая плазма оказывает цитотоксический эффект в отношении лимфоидных клеток *in vitro* (Астафьева, Иванова, 2017; Иванова и др., 2014), а также способствует уменьшению в размере опухолей *in vivo* и увеличивает продолжительность жизни обработанных животных (Иванова, 2006; Laroussi et al., 2017; Miller et al., 2014; Fridman et al., 2007).

Есть исследования, которые свидетельствуют о том, что нетепловая плазма эффективна при стимуляции определенных функций макрофагов. Показано что обработка наносекундным импульсным нетепловым диэлектрическим барьерным разрядом увеличивает миграцию макрофагов *in vitro* при заживлении искусственной раны (Miller et al., 2014).

Несмотря на то, что плазменные технологии продолжает активно изучаться, работ по влиянию излучения плазмы на перитонеальные клетки очень мало.

Таким образом, исходя из опубликованных данных, о биологических эффектах плазмы известно, что в зависимости от времени и дозы воздействия низкотемпературная плазма может вызывать апоптоз, некроз, влиять на адгезивную способность и функциональное состояние клеток, модификацию липидов, белков, нуклеиновых кислот, поверхностных структур. Считается, что основной вклад в биологические эффекты плазмы вносят активные

частицы, АФК и азота, радикалы, но, несмотря на то, что о их роли в модификации макромолекул, в метаболических и окислительных процессах хорошо известно механизм действия в биологических эффектах факторов плазмы не до конца ясен. Перитонеальные клетки благодаря разнообразию внутриклеточных метаболических реакций, многообразию выполняемых функций, участию в различных физиологических процессах, позволяют провести комплексное изучение влияния излучения плазмы разряда на клетки иммунной системы и выбрать оптимальные режимы воздействия, позволяющие контролировать и регулировать функциональную активность клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования

Все эксперименты были выполнены с использованием аутбредных лабораторных крыс Wistar, самцов массой 180 – 200 гр, выращенных в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, и естественном чередовании суточного освещения. Работа выполнена в полном соответствии с этическими принципами, установленными в приказе Министерства здравоохранения и социального развития РФ «Об утверждении Правил лабораторной практики» (GLP) (23.08.2010 г., № 708-н) и соответствовали Директиве Европейского Парламента от 22 сентября 2010 года (2010/63 / ЕС). Исследования были одобрены локальным этическим комитетом Нижегородской государственной медицинской академии (протокол № 2 от 8 февраля 2016 г.).

В качестве объекта исследования использовали перитонеальные клетки крыс. Эксперименты проведены *in vitro* и *in vivo*. В качестве контроля использовали клетки, не подвергавшиеся воздействию.

2.2. Схема и основные этапы эксперимента

Эксперименты проведены в два этапа. На первом этапе проведены исследования *in vitro*. Исследовано влияние излучения плазмы искрового разряда и УФ-излучения на мононуклеарные перитонеальные клетки крыс при режимах воздействия разной длительности: 30, 60, 300, 600 и 1200 с. Времена экспозиции были выбраны согласно исследованию по цитотоксическому действию (Астафьева, Иванова, 2017). Расстояние от источника излучения до образца составляло 30 мм. Исследован цитотоксический эффект, структурные изменения и функциональная активность перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Был проведен сравнительный анализ действия излучения плазмы и УФ-излучения на суспензию мононуклеарных перитонеальных клеток.

Второй этап эксперимента проведен *in vivo* для оценки влияния излучения плазмы разряда на организм животных. Воздействию излучением искрового разряда подвергали переднюю брюшную стенку животных один раз в сутки. Для этого животных разделили на несколько групп: контрольная – животные не подвергались воздействию; животные подвергавшиеся однократной обработке длительностью по 60, 120, 300 и 600 с; животные подвергавшиеся трехкратной обработке длительностью по 60, 120, 300 и 600 с; группы отмены через 10 дней после трехкратной обработки длительностью по 60, 120, 300 и 600 с. Расстояние от источника излучения до образца составляло 30 мм. Забор перитонеальных клеток проводили на следующий день после последнего воздействия. Общее количество и распределение животных по группам, условия эксперимента и численность групп представлены в таблице 1.

Таблица 1

Основные этапы исследования

Этапы исследования	**Экспериментальные серии**	**Группы – время воздействия, с; n – количество проб**	**n – количество животных**
in vitro	Оценка цитотоксического действия излучения плазмы 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)	
		1200 (n=84)	
	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)	
		1200 (n=50)	
in vivo	Контроль	без воздействия	12
	Однократная обработка излучением плазмы	60	7
		120	7
		300	5
		600	5

	Трехкратная обработка излучением плазмы	60	7
		120	7
		300	5
		600	5
	Отмена после трехкратной обработки излучением плазмы	60	6
		120	6
		300	5
		600	5
Общее количество животных			105

2.3. Характеристика применяемого излучения

В эксперименте для генерации излучения плазмы использовали импульсное устройство с определенными параметрами: длительность 1 импульса – 100 мкс, частота повторения импульсов – 10 Гц, энергия в 1 импульсе – $5{,}9*10^{-2}$ Дж, напряжение источника питания – 11 кВ, емкость импульсного конденсатора — 3,3 нФ. Электроды из нержавеющей стали, диаметр каждого – 2 мм, длина – 15 мм, расстояние между электродами составляет 3 мм. Спектр излучения сплошной, максимум спектра при длине волны 220 нм, по мере остывания искрового шнура максимум спектра излучения проходит весь УФ- и видимый диапазон до 700 нм. Пробивное напряжение промежутка – 6 кВ, длительность переднего фронта импульса – 50 нс. Плотность мощности 2×10^{-3} Вт/см^2. Устройство «Пилимин» разработано Пискаревым И.М., ведущим научным сотрудником института ядерной физики им. Д.В. Скобельцина МГУ им М.В. Ломоносова (Пискарев и др., 2014). При этом излучение плазмы импульсное и плотность мощности в одном импульсе выше. В процессе генерации излучения плазмы за счет высокой плотности фотонов, образующиеся первичные активные частицы взаимодействуют между собой с образованием вторичных активных продуктов. В качестве источника УФ-излучения использовали ртутную лампу низкого давления ДКБ-9 (ОАО «ГЗАС им. А.С. Попова», Россия, 2009). Характер спектра лампы линейчатый с максимумом в области λ=254 нм, непрерывная мощность 9 Вт, плотность мощности $2{,}6 \times 10^{-2}$ Вт/см^2.

2.4. Методы исследования

2.4.1. Выделение мононуклеарных перитонеальных клеток

Перитонеальная полость крыс содержит большое количество клеток иммунной системы, в основном макрофагов, которые участвуют во многих физиологических процессах. Поэтому для оценки влияния излучения плазмы и УФ-излучения на клетки иммунной системы использовали клетки перитонеальной полости.

Для выделения притонеальных клеток шприцем с тонкой иглой внутрибрюшинно слева вводили 20 мл стерильного физиологического раствора. Осторожно массировали брюшко в течение 2 мин. После декапитации крысы собирали введенную в брюшную полость жидкость. Полученную жидкость центрифугировали в течение 8 мин при 1500 об/мин (Практикум…, 2004). Для удаления примеси эритроцитов использовали аммонийный буфер (pH = 7,2 – 7,4) (Лимфоциты, 1990). Осадок клеток разводили в растворе Хенкса.

Для того чтобы стандартизировать концентрацию перитонеальных клеток в образцах подсчитывали количество клеток в камере Горяева. К выделенным и отмытым клеткам добавляли стерильный раствор Хенкса доводя объем до 1 мл. Тщательно и аккуратно перемешивали образцы и подсчитывали содержание клеток (Клиническая…, 1999). Подсчет проводили во всех 25 больших квадратах. Расчет числа клеток проводили по формуле:

$$X = (\frac{a * 250}{100})/1000$$

где X – число клеток в 1 мл, в концентрации X * 10^6

a – число клеток в 25 квадратах,

250 – объем квадратов,

100 – количество окон в 25 квадратах

2.4.2. Оценка цитотоксического эффекта

Для того чтобы оценить повреждающее действие и целостность мембран перитонеальных клеток в результате воздействия излучением

плазмы и УФ-излучением исследовали цитотоксический эффект используемых режимов воздействия. Для этого подсчитывали общее количество перитонеальных клеток после воздействия излучением разной длительности.

Общее количество клеток после воздействия анализировали с помощью автоматического цитометра Scepter (Millipore, США). Принцип его работы основан на принципе Культера — изменении электрических импульсов, возникающих при прохождении клеток через апертуру счетного элемента.

2.4.3. Определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста (определение МТТ-редуктазной активности)

Оценка жизнеспособности перитонеальных клеток позволяет выявить устойчивость клеток и внутриклеточных структур к воздействию излучения плазмы и УФ-излучения разной длительности.

МТТ-анализ – колориметрический метод, он основывается на том, что митохондриальные дегидрогеназы клеток преобразовывают водорастворимый синий 3(3,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид в нерастворимый фиолетовый формазан, который накапливается в виде кристаллов в цитоплазме клетки. Формазан переводится в растворенное состояние с использованием органических растворителей. О количестве живых клеток судят по изменению оптической плотности раствора (Митрошина и др., 2015).

К 500 мкл суспензии перитонеальных клеток добавляли 300 мкл раствора МТТ бромида (концентрация 0,25 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе). Суспензию клеток инкубировали с красителем в течение 30 мин. После инкубации пробы центрифугировали при 1500 об/мин в течение 8 мин. Затем удаляли надосадочную жидкость. Для разрушения клеточных мембран в каждую пробирку с осажденными клетками добавляли 300 мкл изопропанола-2 и инкубировали 10 мин. Проводили измерение оптической плотности на спектрофотометре при двух длинах волн: 570нм и 620 нм. Результаты подсчитывали по формуле:

$$E = A_{570} - A_{620}$$

где E – оптическая плотность

A_{570} – значение при длине волны 570 нм

A_{620} –значение при длине волны 620 нм

Количество жизнеспособных клеток рассчитывается по формуле:

$$N = \frac{\text{Еоп}}{\text{Еконтр}} * 100\%$$

где N – количество жизнеспособных клеток

Еоп – результаты оптической плотности опытной пробы

Еконтр – результаты оптической плотности контрольной пробы

2.4.4. Получение фазовых изображений клеток методом лазерной интерференционной микроскопии

Интерференционная микроскопия – метод, который позволяет оценить морфологические параметры и провести прижизненную визуализацию клетки по фазовым портретам без введения в нее красителей. Применение интерференционной микроскопии позволяет создавать высококонтрастные изображения живых клеток в реальном времени.

Принцип действия лазерного интерференционного микроскопа основывается на измерении локальных фаз света, который отражается объектом. Луч лазера в приборе разделяется на два, отраженный луч проходит через клетку, в следствии чего изменяется его фаза. Второй луч называется опорным (контрольным), он через объект не проходит. Когда происходит наложение отраженного и контрольного лучей формируется интерференционная картина или фазовое изображение объекта. Таким образом, измеряется оптическая разность хода двух лучей – фазовая высота. Распределение величины оптической разности хода в разных областях объекта формирует фазовый портрет клетки (Загубиженко и др., 2011).

Исследования проводили с использованием лазерного микроскопа МИМ-340 с длинноходовым прецизионным координатным предметным столом (Швабе, Россия). В работе использовали объектив с оптическим

разрешением 20 нм с апертурой 0,40. Увеличение системы x1000. Размеры регистрируемого кадра составляли 750x480 пикс, при размере пикселя – 0,06831 мкм. Точность измерения по полю – 20,0 нм, по высоте – 0,5 нм. В качестве источника света применяли лазер с λ= 405 нм.

Для визуализации перитонеальных клеток использовали предметные стекла со специальным зеркальным напылением. Для избегания деформации клеток в центр стекла наносили вазелиновую рамку, в нее вносили образец объемом 10 мкл и накрывали покровным стеклом, чтобы исключить высыхание образца. Для анализа измеряли минимальный и максимальный диаметр клетки, максимальную фазовую высоту и площадь сферы, что позволяет оценить состояние клеток в реальном времени.

2.4.5. Экстракция липидов

Экстракцию липидов из суспензии перитонеальных клеток проводили по методу Folch. Суспензию перитонеальных клеток и экстрагент – хлороформ-метанольная смесь (2:1), смешивали в соотношении 1:10. Смесь инкубировали 30 мин при 37°C в пробирках с притертыми пробками. Для удаления водорастворимых примесей и разделения фаз применяли 0,75% KCl. Верхнюю фазу отбирали трижды и каждый раз доводили объем до 10 мл смесью хлороформ : метанол : 0,75% KCl в соотношении 3:47:48 (Folch et al., 1957). Нижнюю фазу фильтровали в 3 пробирки (для определения молекулярных продуктов перекисного окисления липидов и проведения тонкослойной хроматографии) по 1 мл очищенного экстракта липидов и выпаривали на водяной бане до полного испарения растворителя.

2.4.6. Анализ процентного содержания липидов и фосфолипидов

Анализ процентного содержания липидов и фосфолипидов перитонеальных клеток позволяет оценить, как меняется соотношение липидных фракций после воздействия. Содержание и соотношение различных липидных фракций определяет, не только биофизические свойства мембран, но и влияет на их функциональные возможности.

Методом тонкослойной хроматографии анализировали спектр и процентное содержание фосфолипидов и нейтральных липидов. Для этого последовательно применяли две системы растворителей. Пробы наносили специальным микрошприцом на пластины для тонкослойной хроматографии размером 15 х 10 см (Sorbfil, Краснодар, Россия). Перед применением пластины подготавливали следующим способом: последовательно через пластину проходила сначала одна система растворителей, потом вторая, а затем пластины высушивали и инкубировали в течение 15 мин при 120°С. Для разделения полярных липидов применяли первую систему – хлороформ : метанол : вода : гептан с соотношением реагентов 65:25:4:9. При подъеме фронта растворителя на 10 см от нижнего края, хроматографию останавливали, пластину вынимали и высушивали. Для разделения нейтральных липидов хроматографическую пластину помещали во вторую систему гептан : диэтиловый эфир : уксусная кислота с соотношением реагентов 95:4:1. (Творогова и др., 1998, Шаршунова и др., 1980). Для определения зон липидов пластины обрабатывали раствором 10% фосфорно-молибденовой кислотой в этаноле. Затем пластины подвергали инкубированию при 120°С в течение 10 мин. Для идентификации отдельных фракций липидов использовали в качестве метчиков стандартные наборы липидов, а также применяли значения rf (Кейтс, 1975).

На рис. 1 представлен пример получаемой хроматограммы. В результате проведенного исследования идентифицированы следующие липидные фракции: лизофосфатидилхолин (ЛФХ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), свободные жирные кислоты (СЖК), холестерин (ХС), триглицериды (ТГ), эфиры холестерина (ЭХС). Полученные хроматограммы анализировали с помощью программы GelAnalyzer 2010a (http://www.gelanalyzer.com/index.html) бесплатной для некоммерческого использования. Содержание каждой фракции липидов выражали в процентах от суммы всех липидных фракций которую

принимали за 100%. Дополнительно рассчитывали отношение фракции холестерина к суммарному количеству фосфолипидов (ХС/ФЛ).

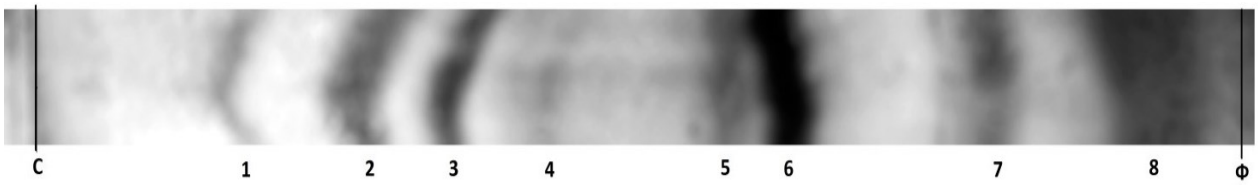

Рис. 1. Пример разделения липидов с применением двух систем растворителей. С – старт, 1 — ЛФХ, 2 — СМ, 3 — ФХ, 4 — ФЭ, 5 — СЖК, 6 – ХС, 7 — ТГ, 8 – ЭХС, Ф – фронт растворителя

2.4.7. Анализ молекулярных продуктов окисления липидов

Процессы окислительной модификации липидов представляют собой реакции деградации ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов. Считается, что основная причина деструкции клеточных мембран — это процессы пероксидации липидов. Анализ молекулярных продуктов окисления липидов позволит выявить механизмы изменения клеточных структур после воздействия.

Интенсивность процессов липопероксидации оценивали по относительной концентрации диеновых конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК), малонового диальдегида (МДА), оснований Шиффа (ОШ). Спектрофотометрические и флуорометрические измерения проводили на спектрофотометре Epoch (BioTek, USA) и флюориметре ФЛЮОРАТ-02 ПАНОРАМА (Люмекс, Россия).

Определение первичных продуктов липопероксидации

Первичными продуктами липопероксидации являются гидроперекиси липидов, при образовании которых в молекуле жирной кислоты формируются сопряженные двойные связи – диеновые конъюгаты (ДК). Липидные экстракты с такими группировками, обладают поглощением в УФ-области спектра (Арутюнян и др., 2000) и их накопление свидетельствует о начальном этапе окислительной модификации липидов.

Для определения ДК выпаривали растворитель из липидного экстракта и добавляли в пробирки смесь метанол : гексан в соотношении 5:1 объемом 4 мл. Пробирки инкубировали при комнатной температуре. После завершения инкубации опытные пробы фотометрировали при λ=232 нм против смеси метанол : гексан (Shenstone, 1971). Уровень ДК выражали в относительных единицах.

Определение вторичных продуктов липопероксидации

К вторичным продуктам липопероксидации относятся ТК и МДА. Их накопление свидетельствует о дальнейшем развитии окислительного стресса, что может приводить к нарушению структурной организации мембран, изменению биофизических свойств и функциональных возможностей клетки.

Определение триеновых конъюгатов

Для определения ТК выпаривали растворитель из липидного экстракта и добавляли в пробирки смесь метанол : гексан в соотношении 5:1 объемом 4 мл. Пробирки инкубировали при комнатной температуре. После инкубации опытные пробы фотометрировали при λ=275 нм, против смеси метанол : гексан (Shenstone, 1971). Уровень ТК выражали в относительных единицах.

Определение ТБК-активных комплексов

Тест с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) основан на способности ТБК реагировать с МДА, продуктом окислительной деградации липидов. В результате реакции образуется триметиновый комплекс, который содержит одну молекулу МДА и две молекулы ТБК (Арутюнян и др., 2000).

К 0,4 мл суспензии перитонеальных клеток добавляли 1,6 мл 50 мМ раствора трисHCl и инкубировали при 37°С в течение 15 мин. В каждую пробирку добавляли по 500 мкл 1Н раствора хлорной кислоты и по 1 мл 0,8% раствора ТБК. Содержимое пробирок перемешивали, полученную смесь инкубировали на водяной бане при 100°С в течение 60 мин. Пробы охлаждали и центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость фотометрировали против холостой пробы при длинах волн 532 нм и 580 нм. Разницу молярных экстинкций рассчитывали

по следующей формуле $\Delta E = E_{532} - E_{580}$. Коэффициент молярной экстинкции $\varepsilon_{МДА}=1,56x10^5$ л·моль$^{-1}$·см$^{-1}$ использовали для расчета концентрации МДА. Концентрацию МДА выражали в нмоль/мл (Smith et al., 1976).

Определение флуоресцирующих продуктов липопероксидации (оснований Шиффа)

Основания Шиффа (ОШ) являются конечными продуктами перекисного окисления липидов и представляют собой продукты взаимодействия альдегида с аминосодержащими соединениями. Накопление ОШ свидетельствует о хронизации процессов липопероксидации и усугублении окислительного стресса, что приводит к развитию деструктивного процесса.

По флуоресценции хлороформных экстрактов на спектрофлюориметре определяют содержание ОШ, они имеют интенсивную голубую флуоресценцию (Арутюнян и др., 2000). После выпаривания растворителя из экстракта добавляли в пробирки по 3 мл смеси хлороформ : метанол в соотношении 1:2 соответственно. Инкубировали пробирки при комнатной температуре. После окончания инкубации измеряли интенсивность флуоресценции при длине волны возбуждения 370 нм и длине волны регистрации 450 нм. Содержание ОШ выражали в относительных единицах (Fletcher et al., 1973).

2.4.8. Определение окислительной модификации белков

Окислительная модификация белков (ОМБ) является ранним и наиболее чувствительным маркером окислительных повреждений. Об активации ОМБ можно судить не только по нарушению структуры полипептидной цепочки, но и отдельных аминокислотных остатков.

Флуоресценция остатков тирозина и триптофана

В качестве маркеров модификации белков рассматривают ароматические аминокислоты: тирозин и триптофан, которые обладают высокой чувствительностью к окислению. Интенсивность флуоресценции

триптофана и тирозина позволяет оценить состояние третичной структуры белка и особенности взаимодействия.

Флуоресценцию тирозина и триптофана измеряли при длине волны возбуждения 275 нм и 288 нм соответственно, длина волны испускания составила 335 нм. Уровень флуоресценции тирозина и триптофана выражали в относительных единицах (Пискарев и др., 2016; Davies, 1987). Флуорометрические измерения проводили на флюориметре ФЛЮОРАТ-02 ПАНОРАМА (Люмекс, Россия).

Флуоресценция гликозилированных белков

По накоплению гликозилированных белков можно оценить состояние третичной структуры белковых молекул. Флуоресценция гликозилированных белков отражает выраженность модификаций, опосредованных ковалентным присоединением.

Флуоресценции гликозилированных белков измеряли при длине волны возбуждения 370 нм и длине волны испускания 421 нм. Уровень флуоресценции гликозилированных белков выражали в относительных единицах (Munch et al., 1997). Флуорометрические измерения проводили на флюориметре ФЛЮОРАТ-02 ПАНОРАМА (Люмекс, Россия).

Определение карбонильных производных

Образование карбонильных групп под действием свободных радикалов – это маркеры, свидетельствующие о наличии серьезных повреждений. Накопление альдегид-динитрофенилгидразонов и кетон-динитрофенилгидразонов возможно в условиях тяжелого окислительного стресса и указывает на значительный ущерб от его воздействия.

Метод определения основан на том, что карбонильные производные окисленных аминокислотных остатков реагируют с 2,4-динитрофенилгидрозином (2,4-ДНФГ) в результате чего образуются окрашенные соединения – 2,4-динитрофенилгидрозоны, которые регистрируются спектрофотометрически (Дубинина и др., 1995).

В ходе работы оценивали уровень спонтанной и индуцированной окислительной модификации белков перитонеальных клеток. К пробе объемом 0,35 мл добавляли 0,65 мл 0,15 М фосфатного буфера (pH 7,4). Пробы инкубировали при 37°С на водяной бане в течение 15 мин. Добавляли к каждой пробе 10 мМ раствор 2,4-ДНФГ в 20% трихлоруксусной кислоте по 1 мл. Пробы инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре, после завершения проводили центрифугирование в течение 15 мин при 3000 об/мин. Надосадожную жидкость удаляли. Для удаления непрореагировавшего 2,4-ДНФГ получившийся осадок дополнительно промывали смесью этилацетат : этанол в соотношении 1:1 и высушивали. Для растворения осадка в каждую пробирку добавляли по 3 мл 8 М раствора мочевины и одну каплю 2Н HCl. Оптическую плотность альдодинитрофенилгидразонов, соответствующих альдопроизводным белков, регистрировали при λ=270нм. Оптическую плотность кетодинитрофенилгидразонов, соответствующих кетопроизводным белков, регистрировали при λ=363нм. Опытные пробы фотометрировали против индивидуального контроля, приготовленного идентично пробе, но вместо 2,4-ДНФГ добавляли 2 Н раствор HCl. Содержание карбонильных производных выражали в относительных единицах.

2.4.9. Определение активности супероксиддисмутазы

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) позволяет оценить влияние излучения плазмы и УФ-излучения на активность белков-ферментов. Так как СОД относится к группе антиоксидантных ферментов и защищает организм от образующихся кислородных радикалов, и, кроме того выполняет контролирующую функцию за счет регуляции стационарной концентрации супероксидных анион радикалов.

Принцип метода основан на ингибировании супероксиддисмутазой восстановления бесцветных тетразолиевых солей супероксидными анион радикалами (Клинико-диагностическое…, 2004; Nishikimi et al., 1972).

Лизат суспензии перитонеальных клеток получали путем последовательного замораживания и размораживания. Для получения супернатанта смешивали 1,0 мл лизата, 0,4 мл смеси этанол : хлороформ (5:3) и 200 мкг KH_2PO_4. Смесь трясли 15 минут, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Супернатант отбирали в отдельные пробирки. Далее в пробирке смешивали 1,75 мл фосфатного буфера (pH=7,8 – 8,0) и 1,0 мл инкубационной смеси, содержащей феназинметасульфат, тетразозий-N-синий и ЭДТА-Na, к полученной смеси добавляли 0,05 мл супернатанта. Реакцию запускали 0,15 – 0,20 мл НАДН. Количество НАДН рассчитывали, измеряя холостую пробу, оптическая плотность которой должна быть 0,68. Оптическую плотность реакционной смеси регистрировали строго через 1 минуту при λ=540 нм против контрольной смеси, содержащей все компоненты, кроме НАДН.

Процент торможения реакции рассчитывали по формуле:

$$\text{С} = \frac{\text{Ехол} - \text{Еоп}}{\text{Ехол}} * 100\%$$

где С – процент торможения реакции

Ехол – результаты оптической плотности холостой пробы

Еоп – результаты оптической плотности опытной пробы

Затем рассчитывали активность супероксиддисмутазы по формуле:

$$\text{А} = \frac{\text{С}}{100 - \text{С}}$$

Активность супероксиддисмутазы выражали в относительных единицах.

2.4.10. Оценка структурного состояния цитоплазматической мембраны с использованием флуоресцентных зондов

Применение флуоресцентных зондов для изучения состояния мембран началось относительно недавно. Использование флуоресцентных зондов с большой точностью позволяет получить информацию о структуре и процессах, происходящих в мембране.

Измерение микровязкости мембран перитонеальных клеток по флуоресценции зонда пирена

Регистрация латеральной диффузии зонда пирена (Sigma Aldrich, США) позволяет оценить изменение относительной микровязкости мембраны клеток. Возбужденная молекула пирена, сталкиваясь с идентичной невозбужденной молекулой, образует комплекс – эксимер (активный димер). Эксимеризация пирена пропорциональна подвижности молекул зонда в бислое мембранвы. Поэтому коэффициент эксимеризации пропорционален текучести мембраны.

Для оценки микровязкости суспензию перитонеальных клеток смешивали с раствором пирена в соотношении 3мкМ на 1 мл суспензии и инкубировали при 37°С в течении 10 мин. Оценку микровязкости в зоне липид-липидных контактов проводили при длине волны возбуждения 334 нм, в зоне белок-липидных контактов измеряли при длине волны возбуждения 286 нм, фиксировали интенсивность флуоресценции эксимеров и мономеров при длине волны испускания 395 нм и 470 нм соответственно (Самойлова, 2006).

Показатель микровязкости вычисляли как коэффициент эксимеризации пирена по формуле:

$$\text{Кэкс} = \frac{F(470)}{F(395)}$$

где Кэкс – коэффент эксимеризации

F (470) –интенсивность флюоресценции эксимеров ($\lambda_{исп}$= 470 нм)

F (395) –интенсивность флюоресценции мономеров ($\lambda_{исп}$= 395 нм)

Коэффициент эксимеризации имеет обратную зависимость от микровязкости. Значения микровязкости выражали в относительных единицах. Флуорометрические измерения проводили на флюориметре ФЛЮОРАТ-02 ПАНОРАМА (Люмекс, Россия).

Оценка углеводородного слоя мембран клеток по флуоресценции зонда 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена

Измерение флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена (ДФГ) (SigmaAldrich, США) позволяет проанализировать состояние углеводородного слоя плазматических мембран. Зонд ДФГ располагается параллельно жирнокислотным цепям в гидрофобной зоне липидного бислоя. Интенсивность флюоресценции свидетельствует о степени упорядоченности углеводородных хвостов фосфолипидов (Молотковский, 1999; Canto et al., 2016). Чем выше интенсивность флюоресценции, тем больше упорядоченность соответствующих областей.

К суспензии клеток добавляли ДФГ в концентрации 2 мкМ на 1 мл. Смесь инкубировали при 37°С в течение 60 мин. Интенсивность флюоресценции оценивали при длине регистрации 430 нм и длине возбуждения 360 нм (Ranall et al., 2011). Значения флуоресценции выражали в относительных единицах. Флуорометрические измерения проводили на флюориметре ФЛЮОРАТ-02 ПАНОРАМА (Люмекс, Россия).

2.4.11. Оценка концентрации сиаловых кислот на поверхности мембран перитонеальных клеток

Сиаловые кислоты (ацильные производные нейраминовой кислоты), находятся на концах боковых цепей углеводов и отвечают за общий заряд на поверхности клетки. При отщеплении меняются адгезионные свойства клеток и поверхностный заряд.

Концентрацию сиаловых кислот (СК) измеряли в надосадочной жидкости суспензии клеток с использованием набора реагентов СИАЛОТЕСТ 100 (НПЦ «ЭКО-СЕРВИС», Россия) спектрофотометрически. Измерение проводили на спектрофотометре Epoch (BioTek, USA) при λ=532 нм. Концентрацию СК выражали в ммоль/л.

2.4.12. Оценка адгезивных свойств перитонеальных клеток

Способность перитонеальных клеток к адгезии является показателем физического и функционального состояния плазматической мембраны.

Оценка адгезивных свойств позволяет судить об активации клеток и о их способности выполнять свои функции.

Адгезивные свойства перитонеальных клеток оценивали по интенсивности прилипания к пластику. Посев клеток производили на чашки Петри диаметром 40 мм. Суспензию перитонеальных клеток объемом 1 мл и среду ДМЕМ объемом 3 мл вносили в чашки, а затем инкубировали в термостате при 37°С в течение 60 мин. После инкубации содержимое чашек аккуратно сливали. Чашки высушивали при комнатной температуре. Проводили фиксацию метанолом в течение 3 мин и окрашивали препараты по Романовскому. Препараты микроскопировали при 600-кратном увеличении (х40). Для оценки адгезии подсчитывали клетки, которые прикрепились к поверхности в 10 световых полях зрения.

2.4.13. Определение активности миелопероксидазы

Миелопероксидаза (МПО) – фермент, который относится к гем-содержащим белкам, аккумулируется в азурофильных гранулах и образует гипохлорит-анион, который будучи сильным окислителем, обеспечивает в процессе фагоцитоза антимикробные, антивирусные, противогрибковые и другие эффекты в отношении объектов фагоцитоза (Ягода, 2005). Определение активности МПО позволяет оценить состояние пероксидазозависимых механизмов биоцидной системы клеток.

Для оценки активности МПО готовили мазки из суспензии перитонеальных клеток. Мазки фиксировали в холодном спирт-формалине в соотношении 1:9 в течение 30 с и затем промывали в проточной воде. На мазки наносили субстрат: 200 мг бензидина, 6 мл этилового спирта, 4 мл дистиллированной воды, 2 капли 3% раствора перекиси водорода на 20 мин, после чего мазки повторно промывали проточной и споласкивали дистиллированной водой. Ядра клеток докрашивались краской Романовского. Препараты микроскопировали с использованием иммерсионной системы при увеличении ×100. Оценку цитохимической реакции проводили, подсчитывая 100 клеток. Определяли активность МПО

по количеству гранул сине-коричневого цвета в цитоплазме нейтрофилов. Средний цитохимический индекс (СЦИ) рассчитывали по формуле:

$$\text{СЦИ} = \frac{\text{A} * 0 + \text{B} * 0{,}5 + \text{C} * 1 + D * 1{,}5}{100}$$

где: A – количество клеток без гранул (0 степень активности)

B – количество клеток, в цитоплазме которых видны хорошо окрашенные гранулы, занимающие 1/4 цитоплазмы (1 степень активности)

C – количество клеток, в которых гранулы занимают 3/4 и более цитоплазмы (2 степень активности)

D – количество клеток, гранулы в которых занимают всю цитоплазму и наслаиваются на ядро

2.4.14. Оценка функциональной активности перитонеальных клеток методом люминолзависимой хемилюминесценции

Измерение люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) позволяет оценить функциональное состояние клеток. Люминол в присутствии АФК окисляется и дает электронвозбужденные карбонильные хромофоры с высоким квантовым выходом. Они резко повышают интенсивность свечения, связанного с образованием АФК (Владимиров, Проскурнина, 2009; Рощупкин и др., 2006; Хабибуллин, Федосов, 2006). Спонтанная ЛЗХЛ отражает уровень продукции АФК клетками, а индуцированная стимуляторами ЛЗХЛ отражает потенциальную, резервную способность клеток реагировать на стимул (Маянский и др., 1996).

ЛЗХЛ регистрировали при постоянной температуре 37°С в 96-луночных планшетах для иммунологических реакций на хемилюминометре LuminoskanAscent (ThermoFisherScientific, Финляндия). К 100 мкл суспензии клеток добавляли 100 мкл раствора люминола (0,48 мг/мл) (Chemapol, Чехия). Пробы делали в четырех повторах. Ставили два параллельных теста: в две лунки вносили по 50 мкл раствора Хенкса и измеряли спонтанную ЛЗХЛ, в две другие вносили по 50 мкл стимулятора фитогемагглютинина в концентрации 200 мкг/мл и измеряли индуцированную ЛЗХЛ. Измерения

проводили через каждую минуту в течение 30 минут. Учитывали результат на пике ЛЗХЛ и время наступления максимального уровня ЛЗХЛ.

2.4.15. Оценка фагоцитарной активности клеток

Фагоцитоз – неотъемлемая функция тканевых макрофагов, которая является основным звеном неспецифической защиты организма и необходима для инициирования адаптивного иммунного ответа. Оценка фагоцитарной активности позволяет определить состояние защитных свойств клеток.

Для оценки фагоцитарной активности перитонеальных клеток использовали частицы латекса размером 0,8 мкм. В планшетах для иммунологических реакций смешивали латекс с перитонеальными клетками в соотношении 1:1. Инкубировали смесь при 37°С в течение 30 мин, планшеты встряхивали каждые 10 мин. По завершении инкубации делали мазки на предметных стеклах и окрашивали по Романовскому. Препараты микроскопировали, подсчитывали 100 клеток, из них определяли фагоцитарный индекс – процент фагоцитарно активных клеток. За фагоцитарно активные принимали клетки, поглотившие три и более частицы латекса. И подсчитывали фагоцитарное число – среднее число, поглощенное одним фагоцитом, частиц латекса.

2.4.16. Оценка кислородзависимого метаболизма клеток по реакции восстановления нитросинего тетразолия

Постановка спонтанного и активированного тестов с нитросиним тетразолием (НСТ) позволяет оценить состояние метаболической активности клеток. Под влиянием дегидрогеназной системы клеток бесцветный НСТ восстанавливается в темно-фиолетовые гранулы диформазана (Маянский, Винсман, 1979). Реакция с НСТ отражает кислородзависимый метаболизм и образование свободных радикалов. Изучение кислородзависимого метаболизма перитонеальных клеток позволяет оценить не только функциональную активность клеток, но и определить резерв метаболических процессов.

НСТ-тест проводили в планшетах для иммунологических реакций. При спонтанном варианте смешивали 50 мкл суспензии клеток, 25 мкл раствора Хенкса и 25 мкл 0,2% раствора НСТ. При активированном варианте вместо Хенкса вносили раствор опсонизированного зимозана (3 мг/мл). Смесь осторожно пипетировали и инкубировали при 37°С в течение 30 мин, планшеты встряхивали каждые 10 мин. По завершении инкубации делали мазки на предметных стеклах и окрашивали 2% водным раствором метиленового зеленого. Препараты микроскопировали, подсчитывали 100 клеток, среди которых определяли количество клеток с включениями диформазана. Рассчитывали коэффициенты активности клеток по формулам:

$$\%\text{НСТ} = \frac{(\text{B} + \text{C} + D) * 100}{n}$$

$$\text{ИА} = \frac{\text{A} * 0 + \text{B} * 1 + \text{C} * 2 + D * 3}{100}$$

где: %НСТ – активность НСТ-теста для спонтанного (сп) и индуцированного (инд) теста

ИА – индекс активации для спонтанного и индуцированного теста

А – количество клеток, не содержащих диформазановых гранул

В – количество клеток, в которых площадь отложений диформазана не превышает 1/3 (1 степень активности)

С – количество клеток, в которых площадь диформазановых отложений занимает от 1/3 до площади ядра (2 степень активности)

D – количество клеток, в которых сине-фиолетовые гранулы превосходят площадь ядра, и клетка напоминает кляксу (3 степень активности)

Коэффициент метаболической активности (КМА) рассчитывали по формуле:

$$\text{КМА} = \frac{\%\text{НСТ(инд)} + \%\text{НСТ(сп)}}{\%\text{НСТ(инд)}}$$

Показатель резерва (ПР) клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{ПР} = \frac{\%\text{НСТ(инд)}}{\%\text{НСТ(сп)}}$$

2.4.17. Статистическая обработка данных

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

3.1. Влияние излучения плазмы искрового разряда и УФ-излучения на мононуклеарные перитонеальные клетки в эксперименте *in vitro*

3.1.1. Анализ цитотоксического действия излучения плазмы и УФ-излучения

При исследовании действия различных факторов на клетки и организм в целом важно оценить их влияние на отдельные системы и клеточные функции. На первом этапе эксперимента оценивали цитотоксическое действие после излучения плазмы и УФ-излучения. Для этого подсчитывали общее количество клеток после обработки, оценивали жизнеспособность и параметры фазовых портретов.

Установлено, что режимы воздействия длительностью 30 и 60 с не оказывают влияние на количество перитонеальных клеток как после воздействия излучением плазмы разряда, так и после УФ-излучения (рис. 2). Установлено снижение количества перитонеальных клеток при длительных режимах воздействия: 600 и 1200 с после воздействия излучением плазмы на 21,0% и 33,0% соответственно по сравнению с контрольной группой. После обработки суспензии клеток УФ-излучением наблюдается снижение общего количества клеток после воздействия длительностью 300, 600 и 1200 с на 19,0%, 25,0% и 43,0% соответственно. Снижение общего количества клеток после действия излучением плазмы и УФ-излучением свидетельствует о наличии цитотоксического эффекта. При этом мононуклеарные перитонеальные клетки более резистентны к излучению плазмы разряда. После воздействия УФ-излучением количество клеток начинает снижаться уже после воздействия длительностью 300 с и при максимальном времени воздействия общее количество клеток снижается значительнее (рис. 3).

Причиной установленного цитотоксического эффекта излучения плазмы и УФ-излучения может быть повреждение структуры мембраны,

вследствие чего происходит нарушение барьерных, транспортных, защитных свойств мембраны и соответственно функциональной активности клеток. Это может быть связано с трансформацией липидного и белкового компонентов, в результате окислительно-восстановительных реакций в процессе генерации излучения, так как известно, что излучение плазмы и УФ-излучение являются источниками активных продуктов, таких как оксиды азота, свободные радикалы, ионы аммония (Иванова и др., 2012; Пискарев и др., 2013а).

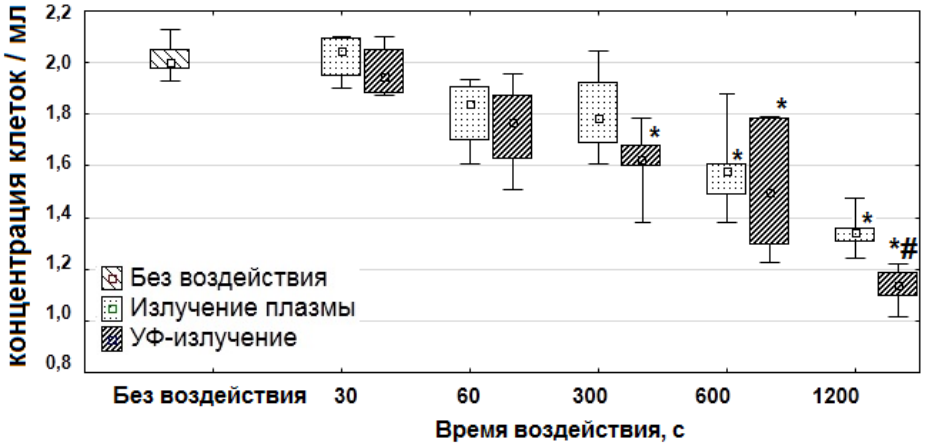

Рис. 2. Общее количество клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: * — по сравнению с контрольной группой, p≤0,05; # — по сравнению с излучением плазмы, p≤0,05

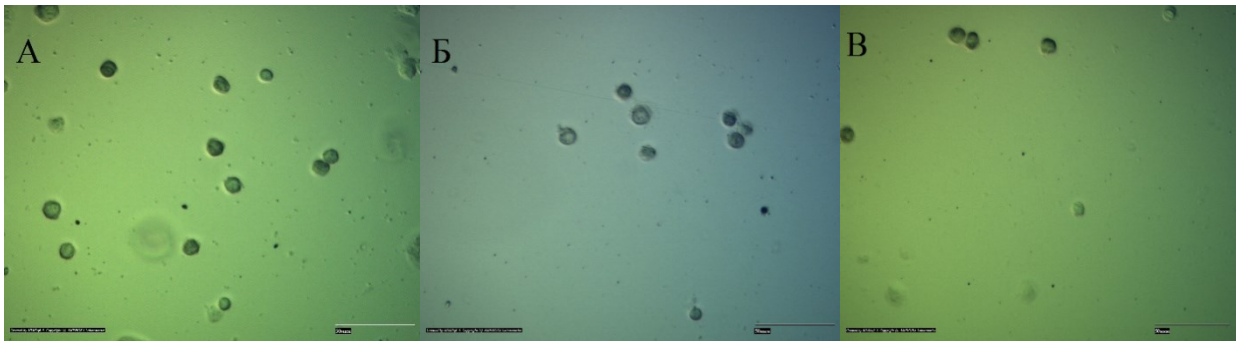

Рис. 3. Мононуклеарные перитонеальные клетки, не подвергавшиеся воздействию (А) и обработанные излучением плазмы (Б) и УФ-излучением (В) в течение 1200 с (увеличение х1000)

Однако общее количество клеток не позволяет судить о жизнеспособности клеток после воздействия. Поэтому далее изучали состояние перитонеальных клеток с помощью определения МТТ-редуктазной активности, свидетельствующей о жизнеспособности клеток. Режимы воздействия длительностью 30 и 60 с не влияют на жизнеспособность клеток как после воздействия излучением плазмы, так и после УФ-излучения (рис. 4). Установлено небольшое снижение жизнеспособности популяции перитонеальных клеток после воздействия длительностью 300 с излучением плазмы на 13,8%. Режимы воздействия 600 и 1200 с излучением плазмы существенно влияют на жизнеспособность клеток, снижая ее на 50,0% и 57,0% соответственно. При УФ-излучении также наблюдается снижение жизнеспособности перитонеальных клеток при режимах длительностью 300, 600 и 1200 с на 20,6%, 56,8% и 65,8% соответственно.

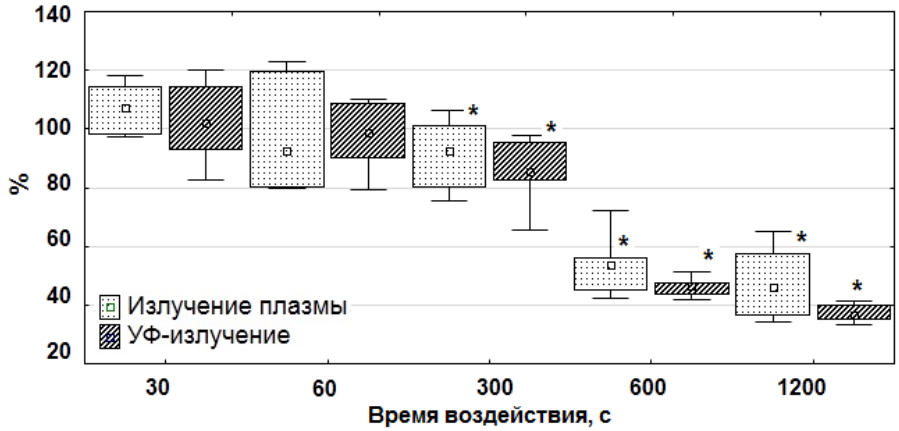

Рис. 4. Жизнеспособность клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: * — по сравнению с группой 30 с, $p \leq 0,05$

Дополнительно для оценки морфологических параметров перитонеальных клеток использовали метод интерференционной микроскопии (рис. 5). Установлено изменение размеров клеток и после применяемых излучений.

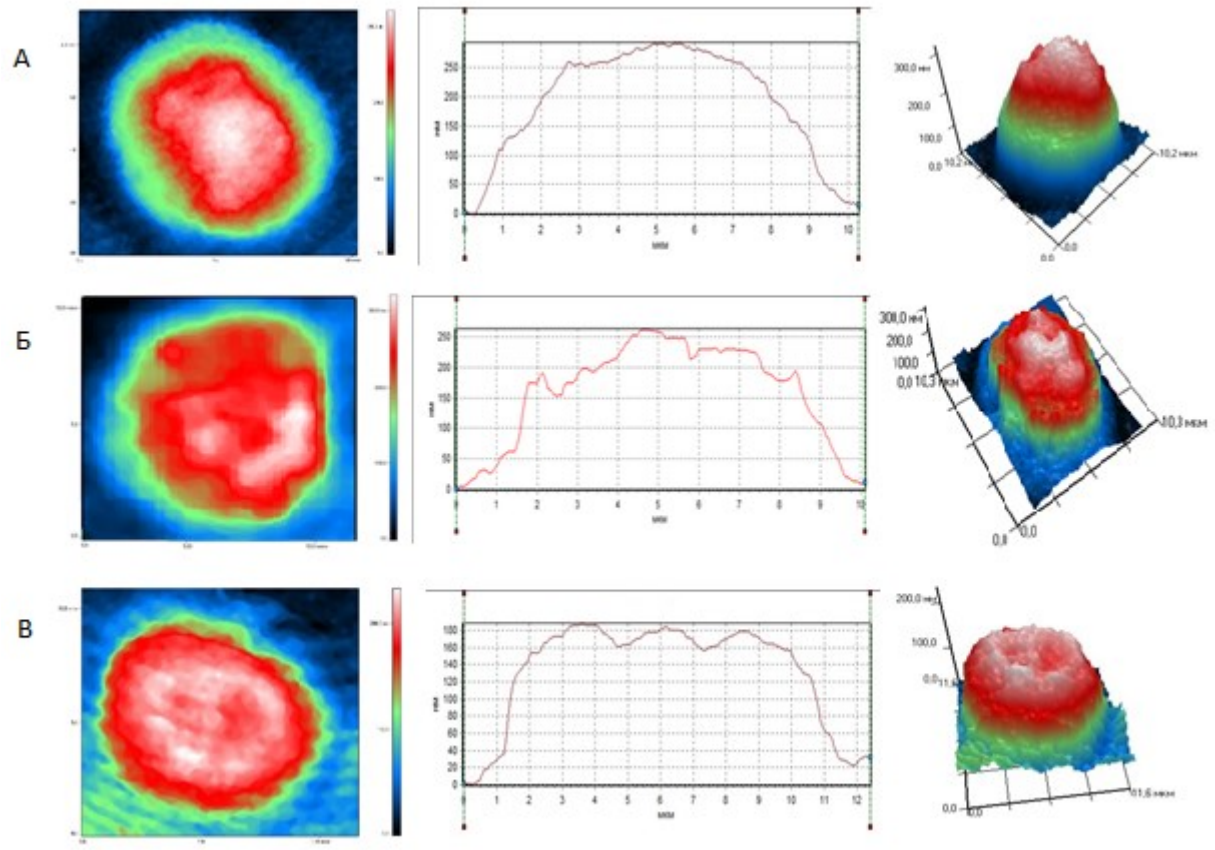

Рис. 5. Фазово-интерференционные портреты мононуклеарных перитонеальных клеток не подвергавшиеся воздействию (А) и обработанные излучением плазмы (Б) и УФ-излучением (В) в течение 1200 с

При режимах воздействия излучением плазмы длительностью 300, 600 и 1200 с наблюдается снижение фазовой высоты клеток на 9,0 – 11,6% (рис. 6). Кроме того, при режиме длительностью 1200 с установлено увеличение максимального диаметра клетки на 14,7% и площади на 61,8%. После воздействия УФ-излучением длительностью 300, 600 и 1200 с наблюдается снижение фазовой высоты клеток на 15,8 – 24,1%. Показано увеличение минимального диаметра клетки при режимах длительностью 600 и 1200 с на 9,8% и 11,3% соответственно. Устанолено при воздействии длительностью 1200 с увеличение максимального диаметра клетки на 21,2%. Площадь клеток увеличивается при длительных режимах воздействия 600 и 1200 с более чем в 2 раза.

Показано, что УФ-излучение интенсивнее влияет на параметры фазовых портретов перитонеальных клеток. При режимах воздействия 600 и 1200 с установлено снижение фазовой высоты на 15,1% и 14,2% по сравнению с излучением плазмы. Также наблюдается увеличение площади клеток на 74,3% и 32,5% соответственно.

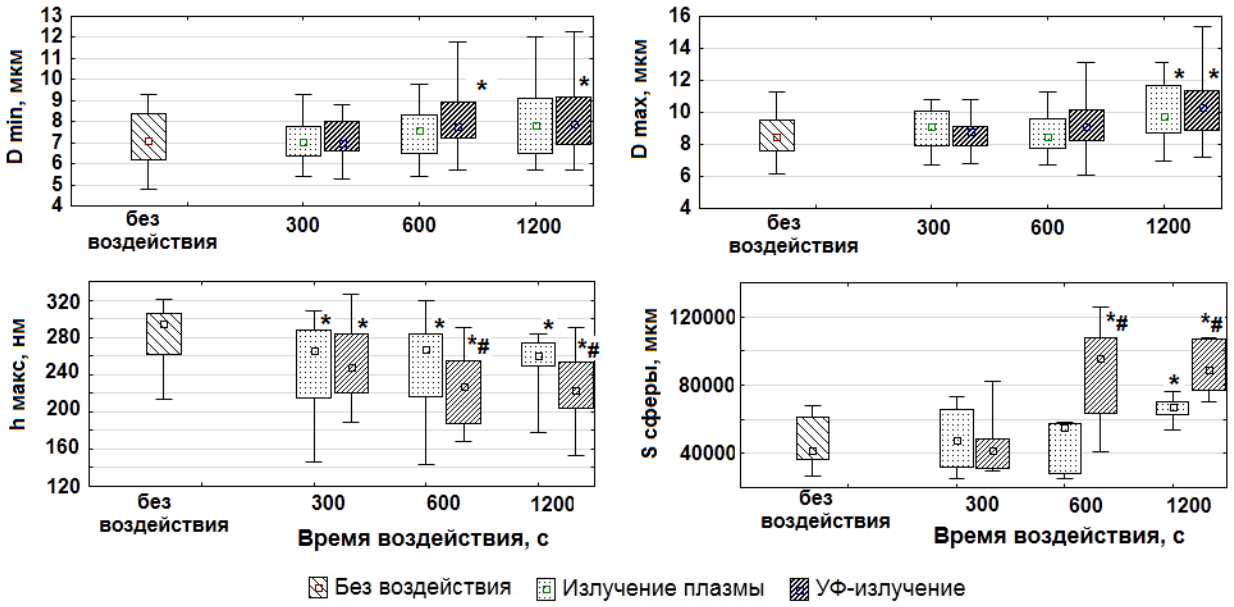

Рис.6. Параметры фазовых портретов клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: * — по сравнению с контрольной группой, p≤0,05; # — по сравнению с излучением плазмы, p≤0,05.

Установленные изменения параметров фазовых портретов клеток характерны при модификациях в мембранах, которые более заметно проявляются при длительных режимах воздействия, что наряду с увеличением объема указывает на увеличение доли поврежденных клеток (Загубиженко и др., 2011). Кроме того, известно, что увеличение объема клеток является наиболее ранним признаком, свидетельствующим об их повреждении. Сохранение формы и объема клеток связано с состоянием цитоскелета и поддержанием определенного осмотического баланса. При этом форма клеток определяется цитоскелетом, а поддержание

осмотического баланса связано с ионной проницаемостью плазматической мембраны и нормальным функционированием белков.

Таким образом, показано, что короткие режимы воздействия не влияют на количество и жизнеспособность клеток. Длительные режимы воздействия: 600 и 1200 с, излучением плазмы и УФ-излучением оказывают цитотоксический эффект на перитонеальные клетки вызывая уменьшение фазовой высоты и увеличение средней площади, снижая общее количество клеток и влияя на жизнеспособность оставшихся клеток.

Результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы в статьях: Arkhipova E. Analysis of the adhesion activity of peritoneal macrophages after exposure to radiation from a gas-discharge plasma and mercury lamp / Arkhipova E., Piskarev I., Ivanova I. // General Physiology and Biophysics. – 2018. – Vol. 37, № 6. – P. 695 – 702

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

Состояние структурных единиц клеточных мембран, а также их расположение и взаимодействие определяет полноценное функционирование клеток. Структурная организация мембран представлена липидным бислоем, белками-ферментами и рецепторами. Биофизические свойства мембран, возможности рецепторов, целостность клеток и их функциональность зависят от соотношения и содержания различных фракций липидов (Булыгин и др., 2001; Köberlin et al., 2016; Marelli-Berg et al., 2012). Основным структурным элементом клеточной мембраны является липидный бислой, а фосфолипиды (ФЛ) в его составе определяют вязкость мембраны, и способность клеток к миграции, слипанию и фагоцитозу (Булыгин, Аксенова, 2010; Dawaliby et al., 2016). Цитоплазматическая мембрана играет основную роль в нормальном функционировании клеточных органелл и клетки и является первой

мишенью для реакционноспособных видов, созданных излучением плазмы и УФ-излучением (Есимова и др., 2006; Hammer et al., 2013).

Далее исследовали липидных состав суммарной популяции перитонеальных клеток. Анализ соотношения липидных и фосфолипидных фракций перитонеальных клеток при кратковременных режимах воздействия излучением плазмы: 30 и 60 с не выявил в сравнении с группой без воздействия статистически значимых изменений (табл. 2). Режимы воздействия излучением плазмы длительностью 300, 600 и 1200 с приводят к увеличению фракции эфиров холестерина (ЭХС) на 14,9 – 31,4%. Кроме того, наблюдается снижение фракции ФЛ при режимах длительностью 300, 600 и 1200 с на 24,5 – 45,6%.

Известно, что возрастание в клетках суммарного холестерина (ХС+ЭХС) позволяет обеспечить стабильность клеточным структурам (Агейченко и др., 2015; Клеменова, 2008; Dawaliby et al., 2016). Ферменты необходимые для синтеза ХС есть во всех клетках кроме зрелых эритроцитов (Биологическая…, 2004). ХС и ЭХС метаболически связаны между собой: ЭХС образуются с помощью этерификации свободного холестерина под действием фермента ацилхолестеролацилтрансферазы (АХАТ), а при необходимости в цитоплазме клеток происходит гидролиз ЭХС под действием фермента холестеролэстеразы с образованием свободного холестерина (Фефелова и др., 2013). Поскольку основной формой для запаса ХС в клетке выступают ЭХС, то возрастание их доли может быть связано с возможными окислительными реакциями в результате воздействия излучением плазмы (Киселев и др., 2015; Есимова и др., 2012).

Фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭ) играют основную роль в стабилизации бислоя мембран и снижение их доли в плазматической мембране клеток может приводить к изменению ее биофизических свойств, снижению проницаемости, а также к ослаблению антиоксидантной защиты мембранных структур клетки (Агейченко и др., 2015; Токтоматова, Атыканов, 2013; Dawaliby et al., 2016).

Таблица 2.

Липидный состав мононуклеарных перитонеальных клеток
после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением

Время воздействия, с		ФЛ, %	ЭХС, %	ТГ, %	ХС, %	СЖК, %	ХС\ФЛ
Без воздействия		21,60 (19,68; 23,94)	33,18 (30,02; 34,10)	8,86 (7,31; 10,52)	29,93 (27,27; 31,14)	7,51 (7,37; 8,28)	1,44 (1,13; 1,52)
Излучение плазмы	*30*	20,16 (20,03; 23,10)	34,65 (31,95; 34,97)	8,92 (8,05; 10,46)	29,10 (28,14; 29,37)	8,04 (7,60; 8,59)	1,44 (1,21; 1,62)
	60	20,48 (19,37; 21,01)	34,57 (34,54; 34,60)	9,98 (9,53; 10,78)	28,83 (28,23; 29,03)	7,17 (6,79; 7,41)	1,38 (1,35; 1,54)
	300	**16,29 (15,05; 16,72)** * p=0,008	**38,43 (38,00; 38,76)** * p=0,002	9,94 (8,88; 11,85)	28,70 (27,52; 30,61)	6,95 (6,54; 7,55)	1,84 (1,72; 1,90)
	600	**16,31 (12,26; 16,31)** * p=0,011	**38,13 (37,56; 41,09)** * p=0,005	8,44 (6,14; 10,25)	30,54 (27,84; 31,87)	7,91 (7,63; 8,35)	1,95 (1,55; 2,59)
	1200	**11,75 (11,09; 11,75)** * p=0,003	**43,60 (41,28; 45,23)** * p=0,003	9,56 (9,37; 10,26)	27,88 (26,09; 28,45)	8,26 (7,48; 8,46)	**2,42 (2,11; 2,59)** * p=0,005
УФ-излучение	*30*	21,08 (18,23; 24,07)	33,91 (30,04; 36,80)	9,94 (8,86; 10,58)	27,70 (26,50; 29,10)	8,23 (7,33; 9,36)	1,32 (1,17; 1,52)
	60	23,30 (20,89; 25,02)	31,53 (29,98; 33,63)	7,27 (6,80; 7,98)	28,40 (27,84; 29,61)	8,80 (8,03; 9,51)	1,22 (1,11; 1,43)
	300	21,94 (20,65; 23,13)	32,22 (31,08; 33,11)	9,42 (8,72; 10,19)	29,84 (27,41; 30,06)	8,68 (7,92; 8,78)	1,36 (1,19; 1,46)
	600	18,04 (14,94; 20,96)	34,27 (32,79; 36,31)	8,07 (7,33; 8,78)	30,33 (30,01; 31,03)	8,28 (7,97; 8,88)	1,68 (1,45; 2,04)
	1200	**14,33 (11,11; 14,72)** * p=0,003	**39,58 (38,48; 45,47)** * p=0,005	6,99 (6,95; 9,05)	29,84 (27,83; 30,20)	9,21 (6,71; 9,61)	**2,05 (1,94; 2,29)** * p=0,008

ФЛ – фосфолипиды, ЭХС – эфиры холестерина, ТГ – триацилглицериды, ХС – холестерин, СЖК – свободные жирные кислоты.
Данные представлены в виде Me (25-й и 75-й процентиль). Статистически значимые различия: * — по сравнению с контрольной группой.

Также отмечается снижение активности ферментов при значительном уменьшении количества ФЛ в мембранах (Булыгин, Аксенова, 2010). Уменьшение фракции ФЛ может быть связано, во-первых, с интенсификацией этерификации холестерина, так как фосфолипиды являются основным источником жирных кислот для этерификации, и прежде всего, фосфатидилхолин (Фефелова и др., 2013; Sengenes et al., 2002). Во-вторых, снижение количества фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина может быть связано с модификацией данных фосфолипидных фракций после воздействия излучением плазмы в результате возможных окислительных реакций.

При режиме длительностью 1200 с наблюдаются наибольшие изменения в липидном спектре популяции перитонеальных клеток, установлено увеличение на 68,0% соотношения холестерина к суммарному количеству фосфолипидов (ХС/ФЛ) (табл. 2), что свидетельствует о перераспределении основных структурообразующих компонентов. Эти изменения в итоге могут влиять на функциональную активность клеток. За счет того, что происходит ограничение поступающих субстратов и нарушение работы рецепторного аппарата снижаются функциональные возможности клеток.

УФ-излучение также оказывает влияние на липидный состав перитонеальных клеток (табл. 2). После воздействия длительностью 1200 с установлено снижение на 33,7% доли ФЛ. Возрастает доля ЭХС на 19,3%, а также наблюдается увеличение на 42,4% соотношения холестерина к суммарному количеству фосфолипидов.

Наблюдаемые изменения липидного спектра после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением характерны для окислительных процессов и свидетельствуют об активации защитных реакций в клетке, что может приводить к ограничению функциональных возможностей и дезорганизации жизнедеятельности клеток (Агейченко и др., 2015; Киселев и др., 2015).

Наблюдаемые изменения липидного спектра перитонеальных клеток характерны для активации окислительных процессов. Измерение адекватного биомаркера окислительного стресса может помочь выявить механизмы изменения клеточных структур, вызванных окислительным стрессом (Colak, 2008). Считается, что процессы пероксидации липидов являются основной причиной деструкции клеточных мембран и системы антиоксидантной защиты (Агейченко и др., 2015). Процессы окислительной модификации липидов – это каскад окислительных реакций деградации ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов. Процессы липопероксидации – необходимое условие нормального функционирования клеток. Свободные радикалы играют важную роль в обновлении липидного состава мембран и способствуют поддержанию активности мембраносвязанных ферментов. С помощью физико-химической системы регуляции происходит поддержание окисления липидов на стационарном уровне, что необходимо для поддержания функциональной активности и гомеостаза клетки (Шишкина, Шевченко, 2010). Поэтому далее оценивали содержание молекулярных продуктов окислительной модификации липидов перитонеальных клеток (табл. 3).

Оценка относительных концентраций продуктов липопероксидации показала, что при выбранных режимах воздействия излучением плазмы снижается концентрация диеновых коньюгатов – первичных продуктов окисления липидов, на 19,5 – 42,7%. Диеновые коньюгаты характеризуют начальную стадию окисления. Это наименее стойкие соединения и их снижение может быть связано с дальнейшей окислительной дегенерацией (Рогалева и др., 2010). При воздействии УФ-излучением не происходило изменения концентрации первичных продуктов окисления липидов.

Накопление триеновых коньюгатов (ТК) и продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой – малонового диальдегида (МДА) являются показателем образования вторичных продуктов липопероксидации (Арутюнян и др., 2000). Изменения уровня ТК в результате действия

излучением плазмы и УФ-излучением не показано. Наблюдается статистически значимое снижение количества МДА после воздействия излучением плазмы в течение 60 с на 7,5%. При длительных режимах воздействия 600 и 1200 с установлено статистически значимое возрастание на 49,0% количества МДА.

Таблица 3.

Влияние излучения плазмы и УФ-излучения на перекисное окисление липидов мононуклеарных перитонеальных клеток

Время воздействия, с		ДК, отн. ед.	ТК, отн. ед.	МДА, нмоль/мл	ОШ, отн. ед.
Без воздействия		0,082 (0,068; 0,095)	0,040 (0,019; 0,047)	3,60 (3,58; 4,87)	0,140 (0,123; 0,167)
Излучение плазмы	*30*	0,049 (0,031; 0,071) * p=0,049	0,021 (0,017; 0,027)	3,85 (3,59; 4,10)	0,138 (0,105; 0,147
	60	0,053 (0,035; 0,066) * p=0,007	0,020 (0,018; 0,040)	3,33 (2,82; 3,59) * p=0,013	0,135 (0,108; 0,140)
	300	0,061 (0,031; 0,067) * p=0,014	0,026 (0,014; 0,038)	4,61 (4,10; 5,38)	0,125 (0,115; 0,138)
	600	0,047 (0,033; 0,065) * p=0,007	0,017 (0,016; 0,040)	5,38 (4,87; 5,90) * p=0,007	0,127 (0,115; 0,159)
	1200	0,066 (0,050; 0,070) * p=0,025	0,019 (0,015; 0,040)	5,38 (4,87; 5,90) * p=0,007	0,117 (0,101; 0,132)
УФ-излучение	*30*	0,061 (0,055; 0,077)	0,028 (0,022; 0,040)	3,97 (3,59; 4,36)	0,134 (0,127; 0,160)
	60	0,060 (0,052; 0,071)	0,021 (0,018; 0,028)	4,23 (3,97; 4,49) # p=0,011	0,144 (0,134; 0,155)
	300	0,070 (0,055; 0,080)	0,020 (0,017; 0,035)	4,74 (3,85; 5,38)	0,129 (0,122; 0,139)
	600	0,068 (0,056; 0,081)	0,029 (0,022; 0,033)	5,00 (4,49; 5,51)	0,148 (0,138; 0,153)
	1200	0,080 (0,061; 0,093)	0,038 (0,033; 0,040)	5,51 (5,13; 6,02) * p=0,010	0,142 (0,129; 0,165)

ДК – диеновые коньюгаты, ТК – триеновые коньюгаты, МДА – малоновый диальдегид, ОШ – основания Шиффа. Данные представлены в виде Me (25-й и 75-й процентиль). Статистически значимые различия: * — по сравнению с контрольной группой, # — по сравнению с излучением плазмы

После воздействия УФ-излучением в течение 1200 с наблюдается на 53,0% накопление МДА. Известно, что возрастание содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) может быть связано с

образованием МДА из жирных кислот с тремя и более двойными связями, а также с тем, что в реакцию с ТБК может вступать не только МДА, но и другие альдегиды так называемые «тиобарбитурореактивные вещества». Поэтому увеличение ТБК-активных комплексов при длительных режимах воздействия может быть связано как с накоплением МДА, так и с реакцией тиобарбитуровой кислоты с альдегидами (Арутюнян и др., 2000; Рогалева и др., 2010).

Так как установлено разнонаправленное изменение содержания вторичных продуктов липопероксидации, далее мы оценивали уровень конечных продуктов перекисного окисления липидов – оснований Шиффа (ОШ), которые являются продуктами взаимодействия альдегида с аминосодержащими соединениями (Биологическая…, 2004). Не наблюдается изменений уровня ОШ при выбранных режимах воздействия как после действия излучением плазмы, так и после УФ-излучения. При этом показано, что эффекты действия излучения плазмы и УФ-излучения носят однонаправленный характер.

Таким образом, показано, что при выбранных режимах воздействия ни излучение плазмы искрового разряда, ни УФ-излучение не активируют процессы липопероксидации (Иванова и др., 2013).

Наиболее ранним, чувствительным и надежным маркером окислительных повреждений является окислительная модификация белков (ОМБ) (Дубинина и др., 2002; Dean et al., 1997; Jackson, 1999). Изменения в структуре белковых молекул влияют на физико-химические и биологические свойства мембран клеток и происходят в условиях окислительного стресса под влиянием активных форм кислорода. В настящее время многие исследователи считают, что при развитии окислительного стресса именно белки плазматических мембран подвергаются атаке активных форм кислорода в первую очередь, а не липиды, что свидетельствует о ведущей роли модификации белков в деструкции мембран клеток (Witko-Sarsat, Friedlander, 2000). ОМБ может быть связана не только с нарушением

структуры полипептидной цепочки, но и отдельных аминокислотных остатков, что приводит к конформации белков и его регуляторно-функциональных свойств (Дубинина и др., 2002). В результате свободнорадикального окисления белков образуются производные аминокислот, в том числе модифицированные остатки триптофана, тирозина и продукты неферментативного гликозилирования белков. Уровни флуоресценции этих молекул используют для оценки степени модификации белков (Дубинина и др., 2002; Hixon, Reshetnyak, 2009).

Таблица 4.

Флуоресценция триптофана, тирозина и гликозилированных белков клеток 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.
Без воздействия	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)	**0,0087 (0,0083; 0,0094) *** p=0,004	0,688 (0,619; 0,693)	0,482 (0,456; 0,502)	0,0082 (0,0079; 0,0083)
60	**0,511 (0,509; 0,553) *** p=0,015	**0,360 (0,314; 0,380) *** p=0,005	**0,0090 (0,0087; 0,0093) *** p=0,003	0,675 (0,656; 0,685) # p=0,037	0,482 (0,467; 0,496) # p=0,028	**0,0093 (0,0090; 0,0094) *** p=0,014
300	**0,355 (0,334; 0,410) *** p=0,003	**0,268 (0,236; 0,305) *** p=0,003	**0,0099 (0,0093; 0,0105) *** p=0,002	**0,497 (0,485; 0,532) *#** p=0,017; 0,014	**0,371 (0,301; 0,432) *** p=0,017	**0,0093 (0,0090; 0,0099) *** p=0,025
600	**0,206 (0,153; 0,235) *** p=0,003	**0,135 (0,090; 0,167) *** p=0,002	**0,0082 (0,0081; 0,0088) *** p=0,022	**0,374 (0,311; 0,391) *#** p=0,010; 0,025	**0,264 (0,217; 0,291) *#** p=0,010; 0,018	**0,0108 (0,0099; 0,0113) *#** p=0,012; 0,018
1200	**0,121 (0,107; 0,122) *** p=0,006	**0,086 (0,077; 0,102) *** p=0,003	**0,0083 (0,0076; 0,0088) *** p=0,022	**0,239 (0,229; 0,265) *#** p=0,011; 0,020	**0,192 (0,184; 0,207) *#** p=0,011; 0,014	**0,0114 (0,0111; 0,0116) *#** 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 выбранные режимы воздействия излучением плазмы 60, 300, 600 и 1200 с приводят к постепенному снижению флуоресценции триптофана и тирозина соответственно на 28,1 – 83,0% и 29,8 – 83,2% по сравнению с контрольной группой (табл. 4). Статистически значимое накопление содержания гликозилированных белков установлено при всех выбранных режимах воздействия излучением плазмой 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 УФ-излучением на перитонеальные клетки в течение 60, 300, 600 и 1200 с приводят к накоплению продуктов гликозилирования белков на 27,4 – 56,2% с увеличением времени воздействия по сравнению с контролем (табл. 4).

Таким образом, наблюдается интенсификация модификации белков перитонеальных клеток как после воздействия излучением плазмы разряда, так и после воздействия УФ-излучением, о чем свидетельствует увеличение содержания гликозилированных белков и снижение флуоресценции остатков тирозина и триптофана.

Снижение флуоресценции триптофана может быть связано с изменением конформации белков, в результате которой при разворачивании белковой глобулы для активных частиц излучения хромофорные группы остатков триптофана становятся доступнее. Кроме того, известно, что триптофан участвует в защите клеток от свободных радикалов. В местах, где наблюдается высокая плотность липидов, для трансмембранных доменов интегральных белков характерна высокая конденсация триптофана и тирозина. Было установлено, что эти места защищют клетки от окислительного повреждения и играют внутри липидного бислоя антиоксидантную роль (Olszewska et al., 2012). Модификация тирозиновых и триптофановых остатков указывает на изменение структурных свойств среды триптофановых остатков в белках, конформацию и деградацию белковых

молекул, и соответственно на изменение их функциональных и регуляторных возможностей (Giulivi et al., 2003; Hixon, Reshetnyak, 2009; Hummel, 2006; Vivian, Callis, 2001). Также значительное снижение концентрации триптофана может приводить к потере защитных способностей мембраны клеток.

Образование гликозилированных белков – это неферментативная ковалентная реакция, результатом которой является присоединение к свободной аминогруппе белка молекулы глюкозы. Образовавшееся соединение в дальнейшем претерпевает последующее превращение без участия ферментов (Colak, 2008; Sathiyapriya et al., 2007). Увеличение гликозилированных белков может приводить к изменению внутриклеточной и межклеточной сигнализации, структурного состояния мембран клеток, нарушению рецепторного аппарата и влиять на функциональную активность перитонеальных клеток (Ансари, Рашид, 2010; Yim et al., 2000), а инактивация ферментов является важным следствием модификации белков (Муравлева и др., 2010; Dean et al., 1997).

Излучение плазмы искрового разряда способствует более интенсивному окислению триптофана и тирозина на 24,3 – 49,4% и 25,3 – 55,4% соответственно по сравнению с УФ-излучением, а накопление продуктов гликозилирования белков идет на 24,1 – 27,2% медленнее (табл. 4). Известно, что благодаря системе развитых двойных связей в своей структуре остатки аминокислот тирозина и триптофана чувствительны в условиях окислительного стресса к повреждению (Абаленихина, Фомина, 2016). В работе (Kondo et al., 2017) показано, что при обработке плазмой существует тенденция разрыва бензольных и имидных колец с образованием связей C–O и C=O. Вероятно, излучение плазмы искрового разряда в первую очередь действует на двойные связи ароматических аминокислот, а УФ-излучение способствует образованию сшивок.

Изменение флюоресценции триптофана, тирозина и гликозилированных белков перитонеальных макрофагов свидетельствует о

модификации белковых молекул после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Известно, что на ранних стадиях тяжелого окислительного стресса преобладает образование альдегид-динитрофенилгидразонов – маркеров фрагментации белков; на поздних кетон-динитрофенилгидразонов – маркеров агрегации белков (Абаленихина и др., 2012; Толочко, Спиридонов, 2010). Так как продукты модификации белков могут служить причиной вторичного повреждения макромолекул (Piroddi et al., 2007; Squier, 2001), а характер модификации белка может предоставить достоверную информацию о типе окислителей, вызывающих повреждение (Colak, 2008), в дальнейшем мы изучали образование карбонильных производных белков.

Установлено, что выбранные режимы воздействия излучением плазмы и УФ-излучением не влияют на увеличение карбонильных производных белков, как при спонтанном, так и при металкатализируемом варианте теста (табл. 5).

Наблюдается уменьшение образования альдегидных форм карбонильных производных белков на 58,3% после воздействия УФ-излучением длительностью 1200 с при спонтанном варианте теста. Кроме того, установлено, что после воздействия УФ-излучением длительностью 1200 с образование альдегидных форм карбонильных производных белков меньше на 39,0% по сравнению с излучением плазмы искрового разряда в спонтанном варианте теста. В металкатализируемом варианте теста образование альдегидных форм карбонильных производных белков меньше на 31,8% и 26,9% соответственно после воздействия УФ-излучением длительностью 600 и 1200 с по сравнению с излучением плазмы искрового разряда. Снижение идентификации альдегидных форм карбонильных производных белков может быть связано с высокой реакционной способностью альдегидов по сравнению с кетонами и активизацией окислительно-востановительных реакций после воздействия УФ-излучением.

Таблица 5.

Образование карбонильных производных белков после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением

Время воздействия, с		Спонтанная		Индуцированная	
		270 нм (альдегиды)	363 нм (кетоны)	270 нм (альдегиды)	363 нм (кетоны)
Без воздействия		0,060 (0,052; 0,065)	0,036 (0,031; 0,042)	0,067 (0,054; 0,074)	0,053 (0,045; 0,065)
Излучение плазмы	*30*	0,058 (0,045; 0,072)	0,043 (0,034; 0,046)	0,084 (0,082; 0,085)	0,057 (0,048; 0,067)
	60	0,064 (0,051; 0,068)	0,035 (0,029; 0,045)	0,056 (0,041; 0,070)	0,045 (0,040; 0,050)
	300	0,058 (0,036; 0,080)	0,040 (0,030; 0,040)	0,054 (0,046; 0,060)	0,051 (0,047; 0,060)
	600	0,055 (0,048; 0,057)	0,030 (0,026; 0,042)	0,066 (0,060; 0,087)	0,048 (0,047; 0,059)
	1200	0,041 (0,035; 0,047)	0,029 (0,026; 0,034)	0,067 (0,060; 0,085)	0,048 (0,047; 0,056)
УФ-излучение	*30*	0,060 (0,056; 0,078)	0,031 (0,028; 0,036)	0,076 (0,072; 0,078)	0,044 (0,041; 0,060)
	60	0,057 (0,054; 0,059)	0,037 (0,030; 0,050)	0,089 (0,080; 0,107)	0,052 (0,046; 0,057)
	300	0,037 (0,027; 0,065)	0,036 (0,032; 0,038)	0,074 (0,058; 0,091)	0,055 (0,049; 0,060)
	600	0,040 (0,023; 0,049)	0,030 (0,026; 0,040)	0,045 (0,042; 0,048)	0,057 (0,043; 0,065)
	1200	0,025 (0,024; 0,028)*# p=0,007; 0,025	0,019 (0,018; 0,022)	0,049 (0,041; 0,053) # p=0,020	0,037 (0,032; 0,055)

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

Карбонильные группы представляют собой маркеры с серьезными повреждениями, вызванными свободными радикалами (Dalle-Donne et al., 2003; Colak, 2008). Их образование возможно в экстремальных условиях и указывает на тяжелый ущерб от воздействия. Преобладание альдегидных форм рассматривают как показатель процесса фрагментации белков с образованием низкомолекулярных фрагментов (Абаленихина и др., 2012). Но, несмотря на то, что в нашем эксперименте наблюдается интенсификация процессов деградации белков, о чем свидетельствует снижение

флуоресценции триптофана, тирозина и увеличение флуоресценции гликозилированных белков можно предположить, что выбранные нами режимы воздействия излучением плазмы и УФ-излучением не приводят к возникновению тяжелого окислительного стресса, так как не происходит накопления карбонильных производных.

Известно, что угнетение антиоксидантной системы неизбежно приводит к накоплению активированных метаболитов кислорода, даже если они образуются в физиологических концентрациях. Следствием такого дисбаланса может быть усиление окислительных процессов (Рогалева и др., 2010). В результате окисления триптофана активными формами кислорода может происходить необратимое ингибирование ряда ферментов (Муравлева и др., 2010; Dean et al., 1997). Медь-цинк-содержащая супероксиддисмутаза (СОД) обнаружена практически во всех аэробных клетках и локализована в цитозоле, межмембранном пространстве митохондрий, лизосомах и пероксисомах (Волыхина, Шафрановская, 2009). Кроме того, СОД рассматривают не только как фермент, выполняющий защитную функцию (Zelko et al., 2002; Landis, Tower, 2005), но и контролирующую, так как она является ключевым звеном в регуляции стационарной концентрации супероксидных анион радикалов (Рогалева, 2010). Снижение флуоресценции тирозина, триптофана и повышение флуоресценции гликозилированных белков указывает на модификацию белковых молекул (Erdem et al., 2009; Sahin, Gümüşlü, 2007), поэтому дополнительно изучали влияние излучения плазмы и УФ-излучения на активность СОД.

При выбранных режимах воздействия не установлено повышения активности СОД как после излучения плазмы, так и после УФ-излучения (рис. 7). Наблюдается снижение активности СОД на 28,2% после воздействия длительностью 60 с излучением плазмы.

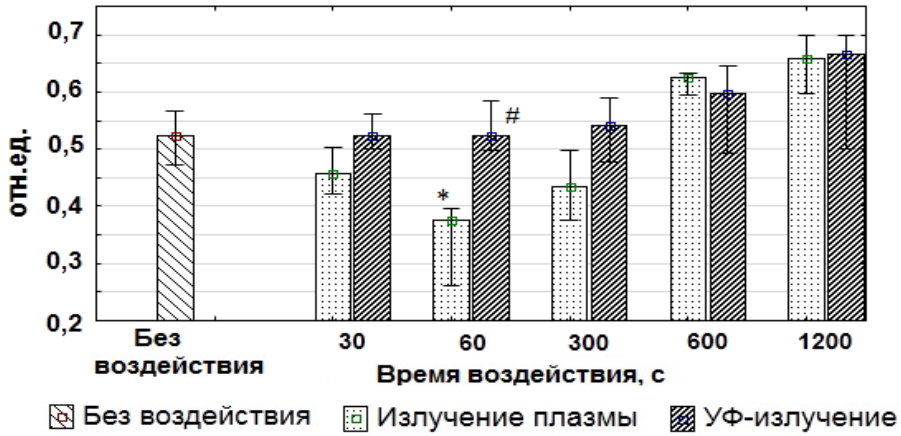

Рис. 7. Активность суперокиддисмутазы перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль. Статистически значимые различия: * — по сравнению с контрольной группой, p≤0,05; # — по сравнению с излучением плазмы, p≤0,05

Известно, что оксид азота, пероксинитрит, инкубация в кислой среде могут вызывать ингибирование СОД (Клебанов и др., 2003) и с этим может быть связано снижение активности СОД после воздействия излучением плазмы (Пискарев и др., 2014). С другой стороны, активность СОД может снижаться из-за уменьшения количества радикалов за счет их рекомбинации между собой. Так как при длительных режимах воздействия активность СОД остается на уровне контрольной группы и даже наблюдается тенденция к повышению, можно предположить, что ингибирования фермента при режиме длительностью 60 с не происходит.

Увеличение активности СОД может быть также следствием активации синтеза СОД *de novo* (Клебанов и др., 2003). В литературе рассматривается концепция свободнорадикального механизма синтеза белков. Показано, что под воздействием различных физико-химичеких факторов внутри клеток образуются небольшие количества (мкмоли) АФК, которые провоцируют образование транскрипционных факторов, а они в свою очередь связываются с промоторными участками гена, запускают экспрессию, транскрипцию и

трансляцию синтеза белков, в частности СОД (Артюхов и др., 2013; Клебанов и др., 2003). В случае перитонеальных клеток образование АФК, необходимых для синтеза белков в клетках, может происходит в результате активации НАДФН-оксидазы в процессе прайминга клеток и формирования кислородного взрыва (Клебанов и др., 2003).

Наблюдаемые изменения липидного спектра и собственной флуоресценции белков перитонеальных клеток указывают на изменение свойств мембран клеток. В настоящее время активно используются специальные флуоресцентные зонды для изучения состояния липидного бислоя мембран. Их основная особенность заключается в том, что они связываются с определенными участками мембраны характерными для каждого зонда. Для комплексной оценки липидов мембран были подобраны зонды, характеризующиеся распределением на разной глубине липидного бислоя (Молотковский, 1999; Kantar et al., 1999). Существует определенная взаимосвязь функциональной активности иммунной системы и состоянием структурных единиц клеточных мембран и их взаимодействия. Микровязкость и полярность выполняют главную роль среди физико-химических параметров, которые характеризуют состояние мембраны и участвуют в регуляции мембранных процессов (Kantar et al., 1999). Оценка микровязкости мембран позволяет охарактеризовать состояние липидного компонента, его структуру и способность к диффузии (Есимова и др., 2006; Dawaliby et al., 2016; Marwali et al., 2003; Radhakrishnan et al., 2000). Изменения метаболизма, а также внешние воздействия влияют на микровязкость мембран. Поэтому далее было проведено исследование микровязкостных свойств мембран мононуклеарных перитонеальных клеток по оценке латеральной диффузии зонда пирена в зоне белок-липидных и липид-липидных контактов. Коэффициент интенсивности эксимер-мономер (Fэ/Fм) отражает степень эксимеризации пирена, определяемую частотой столкновений между пиренными мономерами в липидном бислое, который, в

свою очередь, является функцией плотности молекулярной упаковки (Kastorna et al., 2012; Samoilenko et al., 1999).

Установлено, что кратковременные режимы воздействия: 30, 60 и 300 с не влияют на микровязкость в области липид-липидных контактов (табл. 6). Наблюдается снижение коэффициента эксимеризации пирена Fэ/Fм (334 нм) при длительных режимах воздействия: 600 и 1200 с как после излучения плазмы разряда, так и после УФ-излучения на 23,4 – 35,3% и 20,1 – 38,1% соответственно, что свидетельствует о повышении микровязкости в липидном бислое по сравнению с группой без воздействия.

Таблица 6.

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.
Без воздействия	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)	**0,394 (0,377; 0,401)** *p=0,022	0,425 (0,376; 0,458)	0,404 (0,370; 0,424)
60	0,367 (0,331; 0,407)	**0,330 (0,322; 0,336)** *p=0,008	0,429 (0,381; 0,443)	0,393 (0,372; 0,409)
300	0,348 (0,309; 0,381)	**0,349 (0,325; 0,363)** *p=0,014	0,365 (0,360; 0,372)	**0,342 (0,337; 0,398)** *p=0,014
600	**0,328 (0,309; 0,345)** *p=0,012	**0,362 (0,340; 0,393)** * p=0,008	**0,342 (0,261; 0,349)** *p=0,008	**0,333 (0,325; 0,358)** *p=0,012
1200	**0,277 (0,240; 0,279)** *p=0,008	**0,360 (0,321; 0,393)** *p=0,014	**0,265 (0,207; 0,282)** *p=0,008	**0,305 (0,304; 0,306)** *p=0,008

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

Основными параметрами, которые в целом определяют микровязкостные свойства мембран, являются ненасыщенность липидов, содержание ХС и фосфолипидный состав, количество мембранных белков и процессы модификации макромолекул (Реброва и др., 2012; DeMeyer, Smit, 2009; Dawaliby et al., 2016; Hammer et al., 2013). Полученные результаты показывают, что жирнокислотные цепи мембранных липидов становятся

более насыщенными, так как флуоресцентный зонд пирен с большой скоростью диффундирует в слое мембран, где жирнокислотные цепи фосфолипидов упакованы менее плотно из-за большего содержания в них двойных связей. В исследованиях ряда авторов (Веснина, 2013; Ishii et al., 2005; Gajate et al., 2009) показано, что благодаря наличию микродоменов – липидных рафтов – плазматические мембраны характеризуются неоднородностью. В микродоменах отмечается повышенное содержание холестерола и сфинголипидов, а также насыщенных жирных кислот и, соответственно, для них характерна повышенная структурированность и плотность укладки жирнокислотных цепей, что приводит к снижению числа центров связывания пирена.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в результате действия излучением плазмы и УФ-излучением происходит структурная реорганизация мембран, направленная в сторону уменьшения текучести липидного бислоя, что может быть связано с действием активных частиц, которые образуются под действием излучения.

Далее был исследован параметр Fэ/Fм (282 нм), которыей отражает текучесть аннулярных липидов, которые составляют микроокружение белков мембран. Снижение коэффициента эксимеризации пирена в зоне аннулярных липидов указывает на то, что скорость латеральной диффузии пирена и образование димеров снижается, что позволяет говорить об увеличении микровязкости. Установлено, что воздействие длительностью 30 с не влияет на микровязкость белково-липидных контактов. При режимах излучения плазмы 60, 300, 600 и 1200 с установлено статистически значимое увеличение микровязкости мононуклеарных перитонеальных клеток на 6,0 – 21,2% в области белок-липидных контактов. Воздействие УФ-излучением длительностью 300, 600 и 1200 с также приводит к статистически значимому возрастанию микровязкости на 18,4 – 27,2% в области белок-липидных контактов (табл. 6). Значимых статистических различий между воздействием

излучением плазмы и УФ-излучением не установлено как в зоне липид-липидных, так и зоне белок-липидных контактов.

Возрастание микровязкости бислоя, приводит к ограничению подвижности мембранных липидов, что непосредственно влияет на липид-белковые взаимодействия. Это может приводить к снижению погружения в липидный бислой белков и агрегации мембранных белков с образованием внутри- и межмолекулярных сшивок (Gajate et al., 2009), что в значительной степени снижает функциональную активность белковых комплексов. Полученные данные согласуются с результатами по оценке липидного спектра и собственной флуоресценции остатков тирозина, триптофана и гликозилированных белков. В целом увеличение микровязкости мембран перитонеальных клеток может привести к нарушению целостности белково-липидного каркаса и неработоспособности всей мембранной системы в целом. Подобные изменения могут влиять на конформацию мембранных ферментов, активность и подвижность белков, проницаемость мембран, сигнальную функцию и может привести к невосприимчивости клеток к внешнему регуляторному сигналу.

Микровязкостные свойства и полярность мембраны – физико-химические особенности, которые зависят от подвижности и порядка мембранных составляющих. Эти параметры играют важную роль в модулировании функций клеток. Так как расположение свободного пирена в мембранах строго не установлено (Martins, Melo, 2001), а текучие и пластические свойства бислоя мембран обеспечивает состояние жирных кислот фосфолипидов, то дополнительно был использован более чувствительный зонд 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен (ДФГ). Этот зонд широко используется для получения информации о молекулярной организации плазматических мембран клеток и динамике мембранного гидрофобного углеводородного слоя (Kastorna et al., 2012; Loura, Ramalho, 2011; Repakova et al., 2005). При смешивании этого флуорофора с суспензией мембран

происходит практически полное связывание, и люминесценция водной фазы ДФГ отсутствует (Фотобиофизика, 2008).

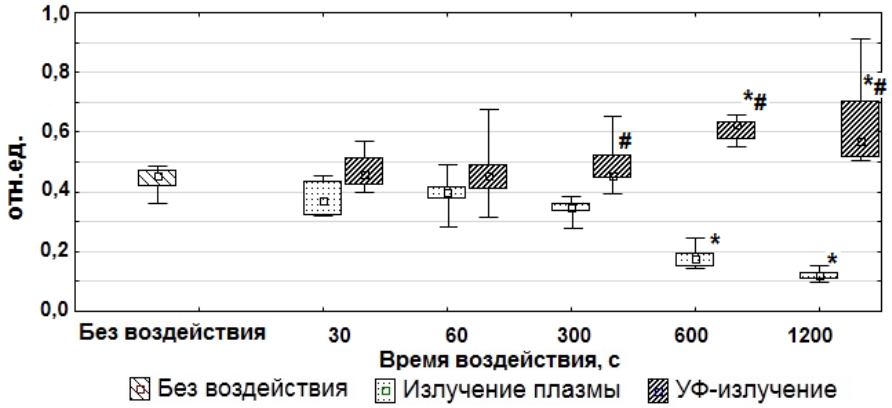

Рис. 8. Интенсивность флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена в бислое мононуклеарных перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: * — по сравнению с контрольной группой, p≤0,05; # — по сравнению с излучением плазмы, p≤0,05

Показано, что короткие режимы воздействия, как излучением плазмы, так и УФ-излучением не влияют на флуоресценцию ДФГ. При режимах воздействия излучением плазмы длительностью 600 и 1200 с установлено снижение на 61,1% и 73,4% флуоресценции ДФГ соответственно (рис. 8). После воздействия УФ-излучением длительностью 600 и 1200 с показано статистически значимое возрастание на 37,4% и 25,7% соответственно флуоресценции ДФГ. Таким образом, излучение плазмы и УФ-излучение приводят к разнонаправленным изменениям флуоресценции ДФГ.

Снижение флуоресценции зонда ДФГ может быть связано со снижением упорядоченности углеводородных хвостов фосфолипидов, образованием в мембране динамических дефектов и кластеров и соответственно приводить к увеличению неспецифической клеточной проницаемости (Биофизика, 2013; Canto et al., 2016; Kastorna et al., 2012). С другой стороны, известно, что ХС обладает способностью модифицировать

параметры липидного бислоя, такие как толщина, молекулярная упаковка, конформация ацильных цепей, гидратация головных групп (Kastorna et al., 2012), происходит образование липидных микродоменов (липидных рафтов), которые характеризуются более плотной упаковкой (Веснина, 2013; Lingwood, Simons, 2010; Marwali et al., 2003; Radhakrishnan et al., 2000). В некоторых случаях рафты могут стабилизироваться за счет белок-белковых и белок-липидных взаимодействий. Можно предположить, что в результате действия излучением плазмы в мембране перитонеальных клеток чередуются участки с более плотной и менее плотной упаковкой молекул. Увеличение флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена после воздействия УФ-излучением указывает на уплотнение бислоя фосфолипидов и снижение проницаемости мембраны (Canto et al., 2016; Kastorna et al., 2012).

Различия эффектов после воздействия излучением плазмы и УФ-излучения могут быть связаны, во-первых, с тем, что излучение плазмы имеет импульсный характер. Во-вторых, при излучении плазмы искрового разряда образуется больше кислотных остатков ионов NO_3^- + NO_2^- чем при УФ-излучении, а выход ионов аммония NH4+ под воздействием УФ-излучения выше, чем при воздействии излучением плазмы (Пискарев и др., 2013а), в-третьих, из работы (Kondo et al., 2017) известно, что для УФ-излучения характерна реакция присоединения с образованием поверхностных связей, а при обработке плазмой существует тенденция разрыва бензольных и имидных колец с образованием связей C–O и C=O.

Одним из компонентов гликопротеидов и гликолипидов плазматических мембран перитонеальных клеток являются сиаловые кислоты – производные нейраминовой кислоты (Пшежецкий, Ашмарина, 2013; Kelm, Schauer, 1997). Функции сиаловых кислот (СК) отличаются многообразием, они являются факторами узнавания в многоклеточных организмах и принимают участие в дифференцировке клеток, межклеточных взаимодействиях, адгезии, миграции, поляризации макрофагов (Пшежецкий, Ашмарина, 2013; Захарян, 2012; Kelm, Schauer, 1997; Seyrantepe et al., 2010).

В гликопротеидах и гликолипидах СК предохраняет конец углеводной цепи от влияния ферментов и, следовательно, оказывают влияние на физико-химические свойства и функциональную активность клеток (Захарян, 2012; Varki, Gagneux, 2012), а повышение уровня нейраминовых кислот в надосадочной жидкости отражает процессы разрушения мембранных структур (Захарян, 2012; Биологическая…, 2004). Поэтому далее был изучен уровень СК в надосадочной жидкости суспензии перитонеальных клеток.

Показано, что кратковременные режимы воздействия, как излучением плазмы, так и УФ-излучением не влияют на уровень СК в надостадочной жидкости. После воздействия на суспензию перитонеальных клеток излучения плазмы искрового разряда установлено увеличение уровня СК при режиме 1200 с на 39,6% (рис. 9). После воздействия УФ-излучением длительностью 600 и 1200 с уровень СК возрастает на 68,4% и 50,0% соответственно.

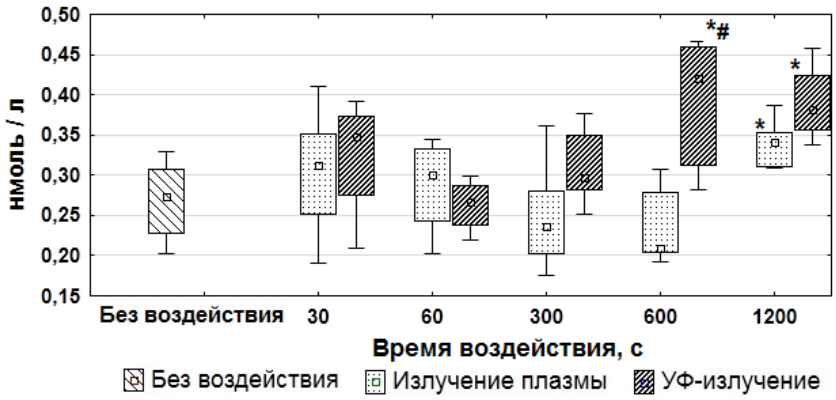

Рис. 9. Концентрация сиаловых кислот в надосадочной жидкости суспензии клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: * — по сравнению с контрольной группой, p≤0,05; # — по сравнению с излучением плазмы, p≤0,05

Ферментами нейраминидазами катализируется отщепление остатков СК от гликолипидов и гликопротеидов. Нейраминидазы ассоциированы с

плазматической мембраной клетки (Захарян, 2012; Monti et al., 2000). Удаляя из компонентов мембран нейраминовую кислоту, этот фермент меняет структуру и общий заряд мембраны. Увеличение содержания СК в надосадочной жидкости свидетельствует об активации процессов десиалирования клеточной мембраны. Потеря СК, во-первых, может приводить к изменению заряда и гидрофильности клеток, во-вторых уменьшает способность клеток отталкиваться друг от друга, в-третьих приводит к нарушению конформации и мембранной топологии рецепторов, и соответственно их способности к взаимодействию (Seyrantepe et al., 2010; Goswami, Koner, 2002).

Возможно, увеличение концентрации СК в надосадочной жидкости перитонеальных клеток связано с активацией фермента нейраминидазы. Известно, что состав гликопротеинов в мембранах как количественный, так и качественный в результате активации процессов десиалирования и сиалирования меняется и при этом модулируется реакция клетки на определенные сигналы (Пшежецкий, Ашмарина, 2013; Захарян, 2012; Varki, Gagneux, 2012; Wang et al., 2016). С другой стороны, на концентрацию СК на мембране клеток могут также влиять активные частицы. В работе (Goswami, Koner, 2002) выявлена корреляция в условиях окислительного стресса между десиалилированием и накоплением карбонильных производных белков. Что согласуется с нашими данными по флуоресценции остатков тирозина, триптофана и накоплении гликозилированных белков. Уменьшение поверхностного заряда может влиять на функциональные свойства клеток, в частности на способность к адгезии.

Таким образом, как излучение плазмы, так и УФ-излучение влияют на структурное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток. Кратковременные режимы воздействия при этом вызывают небольшое увеличение эфиров холестерина, модификацию ароматических аминокислот и накопление продуктов гликозилирования белков, а также увеличение вязкости мембраны в области белок-липидных контактов. С увеличением

времени воздействия значительнее меняется липидный и фосфолипидный состав, наиболее выраженный при воздействии УФ-излучением. При этом не происходит активации липидопероксидации. Излучение плазмой искрового разряда способствует более интенсивной модификации ароматических аминокислот: тирозина и триптофана, а накопление продуктов гликозилирования белков идет медленнее по сравнению с УФ-излучением. Тем не менее, не происходит нарушения работы белков-ферментов, таких как СОД. Под воздействием излучения плазмы и УФ-излучения происходит структурная реорганизация мембран, направленная в сторону уменьшения текучести в зоне липид-липидных и липид-белковых контактов, но при этом излучение плазмы и УФ-излучение приводят к разнонаправленным изменениям флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена характеризующего организацию углеводородного слоя плазматических мембран. Кроме того, длительные режимы воздействия излучением плазмы и УФ-излучением активируют процессы десиалирования клеточной поверхности. Все эти структурные изменения могут существенно влиять на функции клеток, поэтому далее было изучено функциональное состояние перитонеальных клеток.

Результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы в статьях: Иванова И.П. Анализ активных продуктов излучения плазмы искрового разряда, определяющих биологические эффекты в клетках / Иванова И.П., Трофимова С.В., Карпель Вель Лейтнер Н., Аристова Н.А., Архипова Е.В., Бурхина О.Е., Сысоева В.А., Пискарев И.М. // Современные технологии в медицине. – 2012. – №2. – С. 20–30; Архипова Е.В. Структурное состояние мембран и функциональная активность перитонеальных макрофагов после воздействия газоразрядными устройствами / Архипова Е.В., Иванова И.П. // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т.9, №3. – С. 55–63; Arkhipova, E. Analysis of the adhesion activity of peritoneal macrophages after exposure to radiation from a gas-discharge plasma and mercury lamp / Arkhipova

E., Piskarev I., Ivanova I. // General Physiology and Biophysics. – 2018. – Vol. 37, № 6. – P. 695 – 702.

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

Любые изменения в структурных компонентах мембран влияют на функциональное состояние клеток. Способность организма сохранять гомеостаз во многом зависит от полноценного функционирования клеток иммунной системы. Макрофаги – важные клетки системы врожденного иммунитета, которые необходимы для нормального функционирования защитных сил организма. Клетки перитонеальной полости обладают широким спектром функций в организме и являются рецепторами любого внешнего воздействия. Нарушение функций макрофагов приводит к «молчанию» специфического звена иммунной системы, что приводит к тому, что клетки не реализуют иммунный ответ на антиген (Зубова, Окулов, 2001).

Способность мононуклеарных перитонеальных клеток к адгезии является важным свойством для полноценной реализации клетками своих функций, в том числе и фагоцитоза. Осуществление всех стадий фагоцитоза возможно только при оптимальном функционировании клеточных мембран. Адгезивная способность плазматической мембраны определяет способность клеток фиксироваться на эндотелии и отражает физическое и функциональное состояние мембраны (Зубова, Окулов, 2001).

Воздействие излучением плазмы длительностью 30 и 60 с способствует возрастанию количества клеток, прикрепившихся к пластику на 53,7% и 24,4% соответственно (рис. 10). При длительных режимах воздействия: 600 и 1200 с, наблюдается снижение количества клеток, прикрепившихся к пластику на 84,9% и 85,3% соответственно.

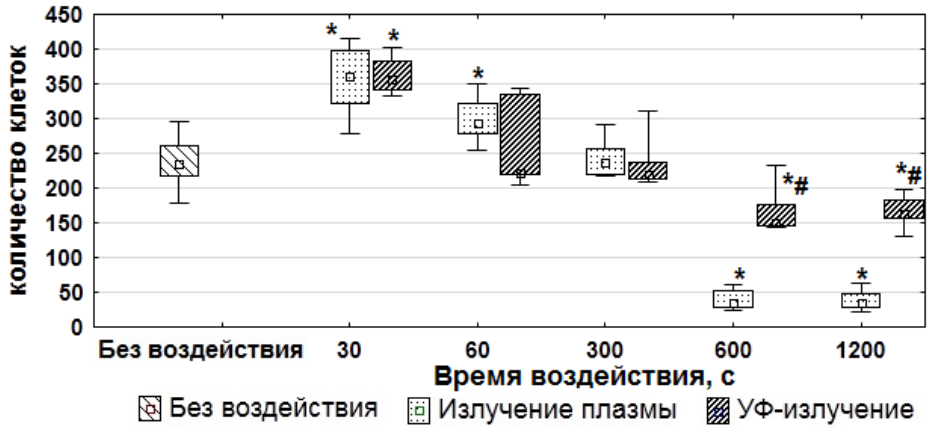

Рис. 10. Адгезивная способность клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: * — по сравнению с контрольной группой, p≤0,05; # — по сравнению с излучением плазмы, p≤0,05

После УФ-излучения также установлено изменение адгезивных свойств клеток. Наблюдается возрастание количества прикрепившихся клеток на 49,5% после воздействия длительностью 30 с. Длительные режимы: 600 и 1200 с также вызывают снижение количества клеток, прикрепившихся к пластику по сравнению с группой без воздействия на 36,7% и 30,4% соответственно. При этом излучение плазмы на 76,2% и 79,0% интенсивнее снижает адгезивную активность перитонеальных клеток по сравнению с УФ-излучением.

Увеличение адгезии фагоцитирующих клеток является одним из факторов, свидетельствующих об активации клеток. Гиперадгезивность – усиление функциональной активности, которая сопряжена с реактивной перестройкой клеток. В стабилизации адгезионных контактов и межклеточных взаимодействиях участвуют специфические адгезионные молекулы. Часть этих молекул содержится в плазматической мембране, а часть в цитоплазме и выводятся на поверхность лишь в результате дополнительной стимуляции, повышая при этом адгезивность фагоцитов.

При помощи молекул адгезии не только регулируются внешние межклеточные взаимодействия, но и определяется метаболический и функциональный статус иммунокомпетентных клеток (Блиндарь и др., 2002; Хаитов, 2011; Sanchez-Madrid, delPoro, 1999).

Все молекулы адгезии принадлежат к семейству иммуноглобулинов и интегринов, и включают в себя адгезины типа C3bi-рецептора, а также такие гликопротеины как Mac-1, p-150, p95, LFA-1, селектины, муцины и кадгерины, которые участвуют в процессах распознавания и часто подвергаются патологическим изменениям (Артюхов и др., 2013; Шопова, 2015; Lessey, 2002). Адгезивные молекулы запускают процесс межклеточной сигнализации, взаимодействуя с мишенью, и его активность зависит от степени экспрессии этих молекул. При этом сам процесс адгезии чувствителен ко многим факторам. Клетки начинают экспрессировать адгезивные молекулы на мембране после связывания с субстратом-мишенью, и происходит запуск процессов активации и метаболической перестройки. Процесс адгезии клеток сопровождается дыхательным «взрывом», активацией пентозофосфатного пути (Крюков и др., 2006) и повышением уровня внутриклеточного Ca^{2+} (Шопова, 2015). За счет улучшения функций сократительного аппарата и ускорения транспорта рецепторов для связывания с лигандом высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо активирует адгезивную способность клеток (Шопова, 2015).

Также процессы адгезии и распластывания фагоцитов непосредственно зависят от функционарования аппарата цитоскелета (Ciobanasu et al., 2012; Myers, Casanova, 2008). Для быстрого реагирования на миграционный сигнал клетки экспрессируют специфический набор белков цитоскелета и адгезии, происходит полимеризация и удлинение актиновых микрофиламентов, один конец которых прикреплен к адгезивным контактам (Bershadsky et al., 2006). Под влиянием изменения концентрации внитриклеточного Ca^{2+} сокращается актинмиозиновый комплекс, повышается гидростатическое давление и активируется фосфорилирование белков, в результате чего для улучшения

контакта с субстратом образуются короткоживущие точечные контакты с субстратом, фокальные комплексы, филоподии, складки клеточного края (Шопова, 2015; Мирошниченко и др., 2014; Ciobanasu et al., 2012). Об изменениях перестройки цитоскелета можно судить по изменениям микровязкостых свойств мембран перитонеальных клеток, так как в исследовании ряда авторов показано, что активация клеток повышает жесткость плазматической мембраны (Гайнитдинова и др., 2014; Roca-Cusachs et al., 2006).

Таким образом, можно предположить, что активация адгезии при кратковременных режимах воздействия связана, во-первых, с усиленной экспрессией молекул адгезии на поверхности мембран, а, во-вторых, с выходом Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Снижение адгезивных свойств клеток при длительных режимах воздействия может быть связано с уменьшением экспрессии интегриновых рецепторов на поверхности мембран, так как известно, что клетки, на которых не выявляются рецепторы CR^{+}, Fc^{+} не способны реагировать на сигналы и соответственно прикрепляться к фагоцитируемому материалу (Блиндарь и др., 2002). Кроме того, под действием активных частиц плазмы искрового разряда может нарушаться структура адгезиновых рецепторов. Так же снижение адгезии может быть связано с потерей сиаловых кислот и соответственно с изменением заряда мембран (Лебедева и др., 2011), что показано при оценке структурного состояния перитонеальных клеток.

Известно, что эффективность иммунного ответа определяется не только поглотительной способностью фагоцитарных клеток, но и наличием в цитоплазме лизосом, которые содержат комплекс гидролитических ферментов. Миелопероксидаза (МПО) – один из ведущих ферментов, лизосомальная каталаза, которая обеспечивает в присутствии перекиси водорода окисление различных субстратов и является основной бактерицидной системой клеток. МПО совместно с НАДФН-оксидазой участвует в процессах образования АФК, в окислении биологического

материала и составляет эффекторное звено кислородзависимого аппарата фагоцитарных клеток. Образующийся в результате активации НАДФН-оксидазы супероксидный анион радикал является предшественником для получения более мощных продуктов, таких как перекись водорода и гипохлорит, которые образуются в результате работы МПО (Nunes et al., 2013). МПО разрушает перекись водорода, которая образуется в процессе жизнедеятельности клеток и является токсичной для клеток (Рязанцева, 2009). Изменение активности МПО в результате стимуляции клеток позволяет оценить способность клеток к дегрануляции и возможность компенсировать потери фермента за счет его образования внутри клетки *de novo*. Поэтому далее изучали активность МПО перитонеальных клеток после воздействия.

Установлено что режимы воздействия длительностью 30, 60 и 300 с не оказывают влияния на активность МПО как после воздействия излучением плазмы разряда, так и после воздействия УФ-излучением (рис. 11). Наблюдается снижение активности МПО на 69,0 % и 86,2% после воздействия излучением плазмы длительностью 600 и 1200 с соответственно. Воздействие УФ-излучением длительностью 1200 с также вызывает снижение активности МПО на 34,5%. При этом активность МПО после воздействия излучением плазмы на 78,9% ниже, чем после воздействия УФ-излучением.

МПО отличается присущим пероксидазным циклом. Изначально нативный фермент взаимодействует с H_2O_2 и происходит двухэлектронное окисление МПО. Для окисленной формы фермента характерна высокая окислительная способность и впоследствии МПО может участвовать в двух альтернативных реакциях. Первая реакция – это одноэлектронное восстановление через редокс-состояние до нативного фермента, но, если в данный момент в системе присутствует H_2O_2 в концентрации, выше необходимой для каталитического цикла, то основная доля МПО переходит в малоактивную форму и скорость реакции резко тормозится. Вторая реакция –

это двухэлектронное восстановление до нативного фермента галогенидом с замыканием цикла галогенирования (Рязанцева, 2009; Власова и др., 2006). В процессе галогенирования происходит окисление ионов галогенов (Cl^-, I^-, Br^-) и образуются высокореактивные агенты, в частности гипохлорная кислота (HOCL), участвующие в окислительной модификации белков, липидов, углеводов, ДНК и обеспечивающие эффективность клеточного ответа (Гавриленко и др., 2014; Pattison, Davies, 2006; Klebanoff, 2005; Araujo et al.,2013).

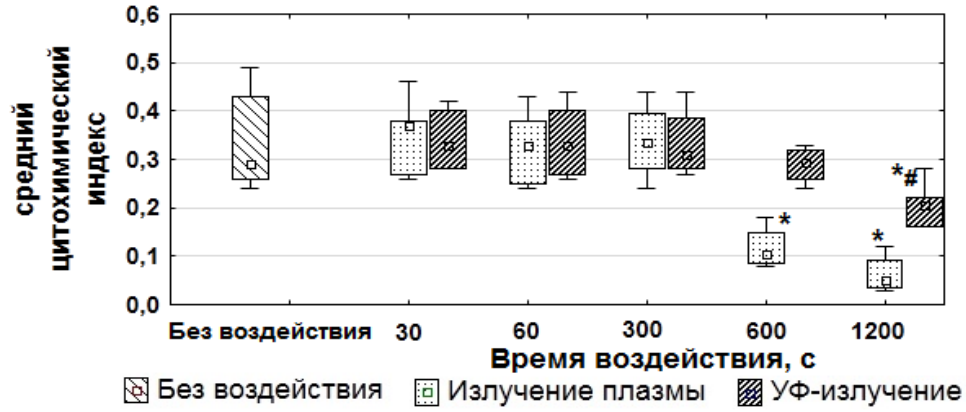

Рис. 11. Активность миелопероксидазы перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: * — по сравнению с контрольной группой, $p \leq 0,05$; # — по сравнению с излучением плазмы, $p \leq 0,05$

Изменения активности МПО является отражением изменения функциональной активности фагоцитов (Меньшикова и др., 2017). Полученные данные свидетельствуют об угнетении пероксидазозависимых механизмов биоцидной системы перитонеальных клеток. Снижение активности МПО в клетках системы мононуклеарных фагоцитов может быть связано как с увеличением в системе концентрации H_2O_2 и инактивацией фермента (Маслов, 2007), так и с тем, что применяемое излучение, может не оказывать токсическое действие непосредственно на клеточную мембрану,

но при этом вызывать дестабилизацию мембранных структур внутри клеток, а в первую очередь лизосомального аппарата (Брюхин, Шаврина, 2013). Кроме того, на функциональную активность МПО могут влиять активные формы азота, выполняя роль субстрата пероксидазного цикла они смещают реакцию в сторону образования редокс-соединения фермента и соответственно снижают галогенирующую активность (Рязанцева, 2009; Власова и др., 2006). Также, активность МПО существенно зависит от pH среды, пероксидазная активность фермента снижается при смещении pH с 7,0 до 5,0 (Власова и др., 2006). Так как известно, что в процессе генерации излучения плазмы разряда происходит снижение pH и накопление азотсодержащих радикалов (Пискарев и др., 2013б; Пискарев и др., 2015) вероятно уменьшение активности МПО при длительных режимах воздействия связано с этими процессами. При воздействии УФ-излучения не происходит уменьшение уровня pH, а накопление азотсодержащих радикалов идет не столь интенсивно (Пискарев и др., 2013а), поэтому снижение активности МПО может быть связано с нарушением внутриклеточных мембранных структур. Также известно, что МПО может путем вытекания из клетки секретироваться во внеклеточное пространство во время фагоцитоза, в результате клеточного лизиса или, когда воздействию растворимых стимулов подвергаются фагоциты (Рязанцева, 2009). В литературе встречаются данные, что МПО может выполнять не только защитную, но и другие функции. Было обнаружено, что МПО индуцирует секрецию некоторых цитокинов и выполняет роль субстрата для адгезии лейкоцитов (Гавриленко и др., 2014; Araujo et al., 2013; Johansson et al.,1997). Возможно, клетки перитонеальной полости выделяют миелопероксидазу в качестве эндогенного адгезивного субстрата, чтобы компенсировать снижение адгезивной функции.

При изучении функционального состояния фагоцитирующих клеток важное значение имеет способность продуцировать АФК, поэтому была изучена люминолзависимая хемилюминесценция (ЛЗХЛ) на следующем

этапе исследования. ЛЗХЛ можно использовать для оценки степени генерации клетками АФК, в том числе гидроксильного радикала, супероксидного анион-радикала, синглетного кислорода, гипохлорида, зарегистрировать выработку АФК в динамике, а также оценить общее функциональное состояние фагоцитов (Владимиров, Проскурнина, 2009; Образцов и др., 2015; Хабибуллин, Федосов, 2006).

В результате действия излучением плазмы на суспензию клеток длительностью 60 и 300 с установлено статистически значимое возрастание на 94,0% и 130,2% уровня спонтанной ЛЗХЛ соответственно (рис. 12 А).

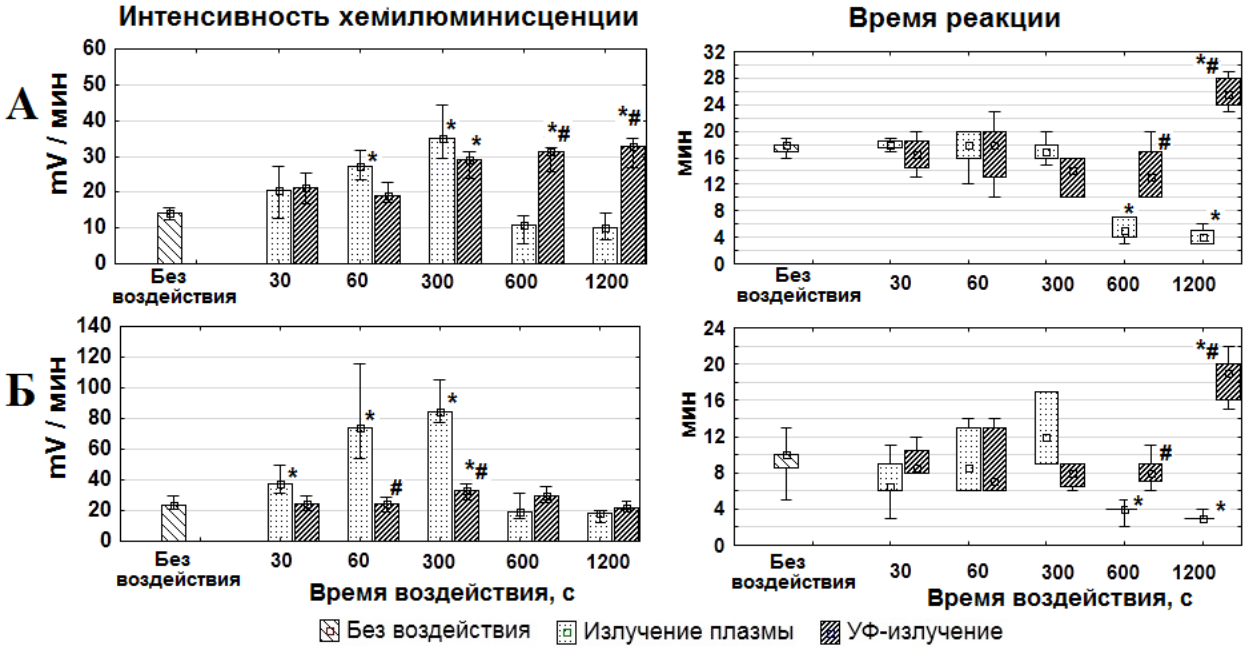

Рис. 12. Уровень спонтанной (А) и индуцированной (Б) люминолзависимой хемилюминесценции клеток после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением. Графики интенсивности хемилюминисценции представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль. Графики времени реакции представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль, минимальное и максимальное значение по выборке. Статистически значимые различия: * — по сравнению с контрольной группой, p≤0,05; # — по сравнению с излучением плазмы, p≤0,05

При режимах воздействия 600 и 1200 с наблюдается тенденция к снижению спонтанного уровня ЛЗХЛ, отсутствует выраженный пик, но при этом время наступления максимального уровня хемилюминесценции сокращается на 72,2% и 77,8% соответственно. При режимах воздействия УФ-излучением длительностью 300, 600 и 1200 с установлено статистически значимое возрастание на 106,7 – 134,0% спонтанного уровня ЛЗХЛ. Но при этом при длительном режиме воздействия 1200 с увеличивается время наступления максимального уровня хемилюминесценции на 41,7%. Уровень ЛЗХЛ после УФ-излучения длительностью 600 и 1200 с по сравнению с излучением плазмы искрового разряда статистически значимо выше в 2,8 и 3,2 раза, а время наступления максимального уровня ЛЗХЛ выше в 2,6 и 6,4 раза соответственно.

Люминолзависимая хемилюминисцентная активность клеток – важный показатель состояния фагоцитарных клеток, который отражает способность производить АФК и соответственно выполнять свою защитную функцию (Владимиров, Проскурнина, 2009). Известно, что усиленная генерация кислородных радикалов при активации фагоцитов и вызванная ими хемилюминисценция связана с поглощением и киллингом объектов фагоцитоза (Федоров, Леонов, 2007; Хабибуллин, Федосов, 2006). Спонтанная ЛЗХЛ показывает уровень продукции АФК клетками в организме. Индуцированная различными стимулами ЛЗХЛ отражает потенциальную способность клеток реагировать на стимул. Поэтому исследовали уровень индуцированной хемилюминесценции для оценки потенциальной способности мононуклеарных перитонеальных клеток отвечать на стимуляцию (рис. 12 Б).

После воздействия излучением плазмы разряда длительностью 30, 60 и 300 с установлена активация ЛЗХЛ в 1,6 – 3,5 раза. Длительные режимы воздействия излучением плазмы время наступления максимального уровня ЛЗХЛ снижают на 60% и 70% соответственно. УФ-излучение длительностью 300 с способствует активации индуцированной ЛЗХЛ на 43%. Время реакции

при режиме длительностью 1200 с увеличивается на 90%. Кроме того, показано, что уровень индуцированной ЛЗХЛ после воздействия излучением плазмы длительностью 60 и 300 с выше по сравнению с УФ-излучением в 3,1 и 2,8 раза, а время наступления «кислородного взрыва» при длительных временах воздействия ниже в 2,0 и 6,3 раза.

Таким образом, в эксперименте *in vitro* показано, что и излучение плазмы и УФ-излучение влияют на функциональное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток. Происходит увеличение адгезивной способности клеток при коротких режимах воздействия и снижение ее при длительных режимах. При этом излучение плазмы искрового разряда способствует более интенсивному снижению адгезии клеток, что согласуется с результатами по оценке ЛЗХЛ. Короткие режимы воздействия излучением плазмы активируют ЛЗХЛ, как при спонтанном, так и при индуцированном варианте теста. После длительных режимов воздействия излучением плазмы прослеживается тенденция к снижению ЛЗХЛ. При этом время наступления максимального уровня хемилюминесценции, сокращается. Воздействие УФ-излучением напротив увеличивает время реакции как в спонтанном, так и в индуцированном варианте теста. При длительных режимах воздействия снижается активность МПО, которая является основной бактерицидной системой клеток, что может быть связано как с влиянием активных частиц, образующихся после генерации излучения, так и со снижением адгезивной способности.

Результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы в статьях: Архипова Е.В. Структурное состояние мембран и функциональная активность перитонеальных макрофагов после воздействия газоразрядными устройствами / Архипова Е.В., Иванова И.П. // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т.9, №3. – С. 55–63; Arkhipova, E. Analysis of the adhesion activity of peritoneal macrophages after exposure to radiation from a gas-discharge plasma and mercury lamp / Arkhipova E., Piskarev I., Ivanova I. // General Physiology and Biophysics. – 2018. – Vol. 37, № 6. – P. 695 – 702.

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

Фагоцитирующие клетки способны распознавать широкий спектр патогенных микроорганизмов и реагировать, инициируя воспалительный ответ и обрабатывая антигены для презентации. Макрофаги являются чрезвычайно адаптируемыми клетками, которые реагируют на любые внешние воздействия и продуцируют медиаторы, которые мобилизуют системные реакции организма, включая катаболический стресс, повышают метаболическую активность других клеток и влияют на кровоток в ткани и проницаемость капилляров (Lee et al., 2013). Реакция перитонеальных клеток на воздействия *in vitro* хоть и позволяет оценить изменения в структурной организации и функциональной активности, но не может охарактеризовать их поведение в организме в полной мере. В эксперименте *in vitro* невозможно учесть комплексное взаимодействие с другими клеточными популяциями, а также характерный естественный фенотипический полиморфизм (Сарбаева и др., 2016).

Используемое в нашем эксперименте излучение обладает ограниченной проникающей способностью. Эксперименты *in vitro* показали, что излучение плазмы разряда способно активировать функциональные возможности перитонеальных клеток при определенных режимах воздействия. Поэтому далее мы изучали влияние излучения плазмы разряда в эксперименте *in vivo*.

Первоначально оценивали жизнеспособность перитонеальных макрофагов после воздействия излучением плазмы при однократной и трехкратной обработке в течение 60, 120, 300 и 600 с, а также при режиме отмены после трехкратного воздействия (рис. 13). Установлено, что выбранные режимы не влияют на жизнеспособность клеток.

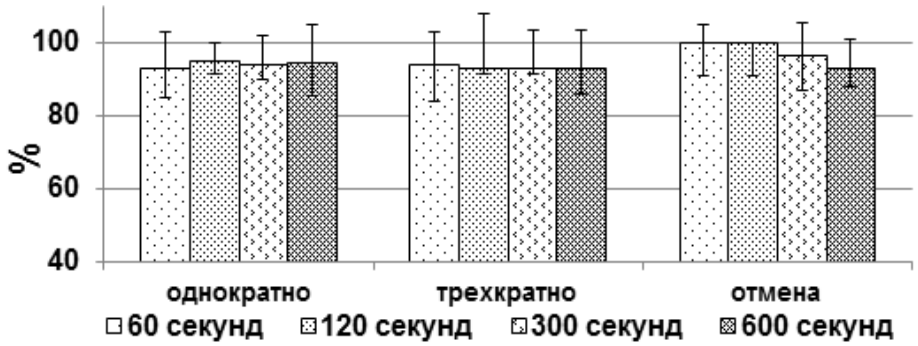

Рис. 13. Жизнеспособность перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы. Графики представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль

Так как в эксперименте *in vitro* показано, что длительные режимы воздействия излучением плазмы активируют процессы десиалирования плазматической мембраны, а снижение концентрации сиалированных остатков на мембране влияет на адгезивные свойства и снижает функциональную активность клеток, далее мы изучали влияние выбранных режимов воздействия на содержание сиаловых кислот в надосадочной жидкости.

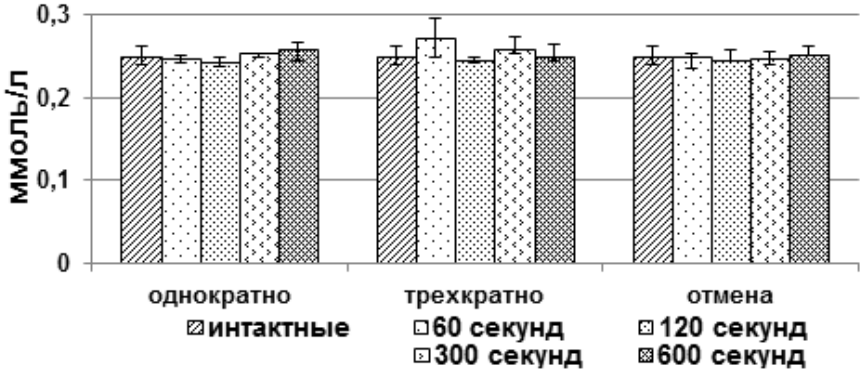

Рис. 14. Концентрация сиаловых кислот в надосадочной жидкости суспензии клеток после воздействия излучением плазмы. Графики представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль

После воздействия на животных излучением плазмы не установлено изменение уровня сиаловых кислот на поверхности мембраны

перитонеальных клеток при выбранных режимах воздействия как по сравнению с интактной группой животных, так и при сравнении групп с однократным и трехкратным режимами обработки (рис. 14).

В эксперименте *in vitro* показано, что кратковременные режимы воздействия излучением плазмы усиливают адгезивную способность перитонеальных клеток. Способность к адгезии – одна из характеристик указывающая на функциональное состояние клеток и необходима для реализации фагоцитоза. Поэтому далее исследовали адгезивную способность клеток после воздействия.

Установлено, что трехкратная обработка в течение 120 и 300 с способствует усилению адгезивных свойств перитонеальных клеток на 25,5% и 21,6% соответственно по сравнению с интактной группой (рис. 15) и на 30,0% и 23,6% соответственно по сравнению с группой с однократной обработкой. Через 10 дней после завершения трехкратной обработки способность к адгезии восстанавливалась до уровня интактных животных.

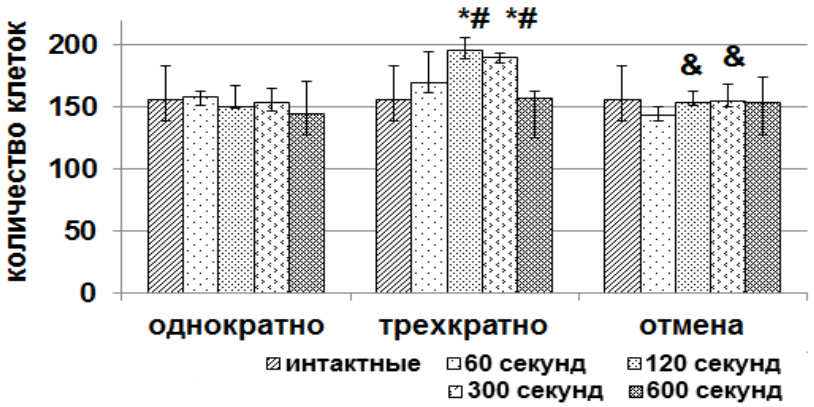

Рис. 15. Адгезивная способность клеток после воздействия излучением плазмы. Графики представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль. Статистически значимые различия: * — по сравнению с интактной группой, p≤0,05; # — по сравнению с группой с однократной обработкой, p≤0,05; & – по сравнению с группой с трехкратной обработкой, p≤0,05

Увеличение адгезионной способности указывает на активацию клеток, что может быть связано со стимулирующим эффектом излучения искрового

разряда и выведением на поверхность клеток дополнительных молекул семейства интегринов, участвующих в формировании адгезионных контактов (Блиндарь и др., 2002; Sanchez-Madrid, delPoro, 1999).

Распознавание чужеродных частиц макрофагами, которое осуществляется с помощью высокореактивного рецепторного аппарата, является одним из необходимых условий адекватного функционирования мононуклеарных фагоцитов. Фагоцитоз является неотъемлемой функцией тканевых макрофагов, имеет важное значение для защиты хозяина, является центральным звеном неспецифической защиты организма и инициирования адаптивного иммунного ответа (Хаитов, 2011; Pavlou et al., 2017). Увеличение способности макрофагов к фагоцитозу является одним из основных факторов, который свидетельствует об активации клеток. Поэтому далее оценивали влияние излучения плазмы на фагоцитарную активность перитонеальных клеток (табл. 7).

Установлено, что однократное воздействие в течение 120 с способствует возрастанию фагоцитарного числа на 7,3% по сравнению с интактной группой. Выявлено, что трехкратное воздействие в течение 120 и 300 с приводит к активации процесса 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. Через 10 дней после завершения трехкратной обработки фагоцитарная активность восстанавливалась до уровня интактных животных.

Активность и интенсивность фагоцитоза – показатели функционального состояния макрофагов. Фагоцитоз является одним из ранних проявлений ответа организма на стимуляцию и включения защитных реакций. Эффект усиления фагоцитарной активности перитонеальных клеток на фоне действия излучения плазмы вероятно связан с повышением функциональной активности этих клеток.

Таблица 7.

Фагоцитарная активность перитонеальных клеток

после воздействия излучением плазмы

		ФИ, %	ФЧ
интактные		67,00 (67,00; 68,00)	2,75 (2,70; 2,82)
однократное	*60 с*	67,00 (65,00; 68,00)	2,84 (2,81; 2,87)
	120 с	69,00 (67,00; 69,00)	**2,95 (2,92; 2,98)** * p=0,012
	300 с	64,00 (62,00; 68,00)	2,81 (2,73; 2,84)
	600 с	63,00 (61,00; 66,00)	2,75 (2,69; 2,82)
трехкратное	*60 с*	64,00(63,00; 65,00)	2,88 (2,84; 2,90)
	120 с	**74,00 (74,00; 76,00)** *# p=0,0101; 0,012	**3,30 (3,15; 3,33**) *# p=0,012; 0,012
	300 с	**75,00 (74,00; 76,00)** *# p=0,012; 0,037	**3,12 (3,12; 3,15)** *# p=0,012; 0,037
	600 с	64,00 (62,00; 68,00)	2,70 (2,65; 2,82)
отмена	*60 с*	63,00 (62,00; 66,00)	2,72 (2,70; 2,76)
	120 с	**64,00 (63,00; 67,00)** & p=0,012	**2,86 (2,81; 2,91)** & p=0,022
	300 с	**63,00 (62,00; 67,00)** & p=0,037	**2,74 (2,68; 2,81)** & p=0,037
	600 с	64,00 (62,00; 67,00)	2,73 (2,69; 2,84)

фагоцитарный индекс – ФИ, фагоцитарное число – ФЧ. 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

Известно, что макрофаги могут находиться в организме в двух функциональных состояниях: резидентном и активированном (Лямина, Малышев, 2014; Петренёв, 2017). Переход макрофагов из одного состояния в другое проходит через промежуточную стадию – прайминг клеток. Для активированных макрофагов характерен значительно более высокий уровень фагоцитарной активности по сравнению с резидентными макрофагами

(Pavlou et al., 2017). Кроме того, первоначально фагоцитоз включает изменения актинмиозинового комплекса, связанный с проглатыванием частиц. Ремоделирование мембран продолжается и после формирования фагосом, поскольку деление и слияние с эндосомами и лизосомами обеспечивают протеазы, катионные пептиды, ионные каналы и транспортеры (Nunes et al., 2013). Что согласуется с активацией адгезионных свойств перитонеальных клеток. Вероятно, трехкратное воздействие в течение 120 и 300 с способствует активации фагоцитарной способности за счет формирования прайминга клеток и активации адгезии.

Одна из стадий фагоцитоза – киллинг поглощенных частиц, который возможен только при полноценном функционировании системы НАДФН-оксидазы, в результате чего образуются АФК, которые оказывают сильное микробоцидное действие (Хаитов, 2011; Арутюнян и др., 2000; Nunes et al., 2013). Ряд исследователей показывает (Клебанов, Владимиров, 1999; Салмин и др., 2014; Dube et al., 2003), что мишенью для действия различных физических факторов является НАДФН-оксидаза, поэтому далее было исследовано влияние излучения плазмы на метаболическую активность перитонеальных клеток. Изучение кислородзависимого метаболизма по постановке теста с нитросиним тетразолием позволяет оценить функциональную активность клеток и определить резерв метаболических процессов.

При однократном воздействии, а также при трехкратном воздействии в течение 60 и 600 с не установлено изменений метаболической активности перитонеальных макрофагов (табл. 8). Показано возрастание позитивно реагирующих клеток при трехкратном воздействии в течение 120 и 300 с на 17,6% и 16,7% в спонтанном варианте НСТ-теста соответственно, и на 13,3% и 11,7% в активированном варианте НСТ-теста по сравнению с интактной группой. Увеличение индекса активации, который отражает активность ферментных систем, в спонтанном варианте теста составило 27,9% и 26,5% и в активированном варианте теста составило 10,3% и 9,2% соответственно.

Таблица 8.

Метаболическая активность клеток после воздействия излучением плазмы

		сп %	инд %	ИА сп	ИА инд	КМА	ПР
интактные		51,00 (50,00; 52,00)	60,00 (58,00; 60,00)	0,68 (0,67; 0,70)	0,87 (0,84; 0,88)	1,86 (1,85; 1,86)	1,16 (1,16; 1,18)
однократное	*60 с*	51,00 (50,00; 53,00)	62,00 (61,00; 63,00)	0,66 (0,63; 0,68)	0,89 (0,88; 0,90)	1,84 (1,79; 1,85)	1,18 (1,18; 1,26)
	120 с	52,00 (51,00; 53,00)	62,00 (60,00; 62,00)	0,70 (0,70; 0,71)	0,88 (0,87; 0,89)	1,85 (1,84; 1,86)	1,17 (1,16; 1,19)
	300 с	53,00 (53,00; 53,50)	61,50 (60,50; 63,00)	0,69 (0,66; 0,71)	0,90 (0,88; 0,91)	1,85 (1,84; 1,86)	1,17 (1,16; 1,18)
	600 с	52,00 (50,50; 52,00)	61,50 (60,00; 62,50)	0,69 (0,66; 0,71)	0,86 (0,83; 0,91)	1,86 (1,78; 1,87)	1,17 (1,16; 1,21)
трехкратное	*60 с*	53,00 (51,00; 54,00)	61,00 (60,00; 63,00)	0,70 (0,70; 0,76)	0,88 (0,87; 0,90)	1,85 (1,84; 1,87)	1,18 (1,15; 1,18)
	120 с	**60,00 (60,00; 62,00)** *# p=0,012; 0,012	**68,00 (66,00; 68,00)** *# p=0,012; 0,012	**0,87 (0,87; 0,88)** *# p=0,011; 0,011	**0,96 (0,95; 1,04)** *# p=0,012; 0,012	**1,91 (1,89; 1,91)** *# p=0,012; 0,012	**1,10 (1,09; 1,12)** *# p=0,012; 0,012
	300 с	**59,50 (59,00; 60,00)** *# p=0,013; 0,012	**67,00 (65,50; 68,00)** *# p=0,014; 0,013	**0,86 (0,82; 0,88)** *# p=0,014; 0,013	**0,95 (0,94; 1,00)** *# p=0,014; 0,013	**1,89 (1,88; 1,91)** *# p=0,014; 0,013	**1,12 (1,10; 1,13)** *# p=0,014; 0,013
	600 с	50,50 (49,50; 51,50)	60,00 (59,00; 61,50)	0,68 (0,64; 0,71)	0,85 (0,80; 0,88)	1,85 (1,82; 1,86)	1,18 (1,17; 1,22)
отмена	*60 с*	51,00 (49,00; 53,00)	61,00 (59,00; 62,00)	0,70 (0,67; 0,71)	0,89 (0,82; 0,92)	1,85 (1,84; 1,86)	1,17 (1,17; 1,20)
	120 с	**50,00 (50,00; 51,00)** & p=0,012	**60,00 (59,00; 60,00)** & p=0,012	**0,68 (0,68; 0,69)** & p=0,011	**0,87 (0,82; 0,88)** & p=0,012	**1,85 (1,82; 1,85)** & p=0,036	**1,18 (1,18; 1,22)** & p=0,036
	300 с	**52,00 (51,00; 53,50)** & p=0,012	**62,00 (61,50; 64,00)** & p=0,012	**0,70 (0,70; 0,76)** & p=0,012	**0,89 (0,88; 0,91)** & p=0,012	**1,84 (1,84; 1,85)** & p=0,041	**1,20 (1,19; 1,20)** & p=0,041
	600 с	50,00 (49,50; 51,00)	60,50 (58,50; 62,00)	0,68 (0,67; 0,69)	0,86 (0,79; 0,89)	1,83 (1,80; 1,88)	1,21 (1,15; 1,25)

сп % – спонтанный, 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.

Установлено небольшое статистически значимое возрастание на 2,7% и 1,6% коэффициента метаболической активности, что свидетельствует о

степени стимуляции макрофагов. Показатель резерва перитонеальных клеток, характеризует потенциальную способность к активации, его снижение составило 5,2% и 3,4%. Через 10 дней после завершения трехкратной обработки метаболическая активность перитонеальных клеток восстанавливалась до уровня интактных животных.

Восстановление нитросинего тетразолия в диформазан, характеризующее усиление кислородного метаболизма, сопровождается резким увеличением потребления кислорода клеткой и образованием АФК. Ключевая роль в этом процессе принадлежит НАДФН-оксидазе (Изикаев и др., 2011б; Салмин и др., 2014; Sheppard et al., 2005). В условиях нормы в покоящейся клетке энзиматическая активность НАДФН-оксидазы ограничена в пространстве разделением мембранных и цитозольных субъединиц (Nunes et al., 2013; Sheppard et al., 2005; Sumimoto et al., 2008). В ответ на внешние раздражители происходит быстрая самосборка мембранно-связанных и цитозольных компонентов НАДФН-оксидазы. Активация НАДФН-оксидазы зависит от времени стимуляции и концентрации стимулирующего фактора (Маянский, 2007; Полежаева и др., 2015; Brechard et al., 2013; Sheppard et al., 2005). При этом рассматривается концепция двухступенчатой активации. Активация НАДФН-оксидазы жестко регулируется при связывании различных индуцирующих частиц с конкретными рецепторами на поверхности клеток (Маянский, 2007; Sheppard et al., 2005; Sumimoto et al., 2008). Происходит фосфорилирование аутоингибирующей области субъединицы p47phox серин-киназами, включая протеинкиназу С, для обеспечения доступа к доменам этой субъединицы. Связывание p47phox с флавоцитохромом b558 имеет решающее значение для транслокации других субъединиц и для содействия переносу электронов между НАДФН и ФАД. Липиды арахидоновой кислоты и анионной мембраны также участвуют в индуцировании конформационных изменений во флавоцитохроме b558 для усиления переноса электронов. Наконец, связывание специфических фосфолипидов с доменами субъединиц PX в

p4phox и p40phox обеспечивает дополнительную степень регулирования (Souabni et al., 2017). Активность НАДФН-оксидазы требует компенсаторного заряда для оптимальной активности. Отсутствие компенсирующего заряда может привести к экстремальным напряжениям, что приведет к самоторможению, основной вклад в компенсацию заряда во время активности НАДФН-оксидазы вносит протонный канал. При этом перенос ионов через мембрану считается важным фактором, регулирующим производство АФК фагосомами (Nunes et al., 2013).

Кроме того, переход перитонеальных клеток в активированное состояние, вероятно, обусловлен взаимодействием клеток с образовавшимися актичными частицами в результате излучения искрового разряда. По данным литературы известно, что в небольших концентрациях H_2O_2 индуцирует хемотаксис клеток, кратковременное повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} и усиливает респираторный взрыв (Klebanov et al., 1998). Предполагается, что увеличение в процессе прайминга клеток их функционального потенциала при взаимодействии стимулятор – рецептор может быть связано с изменением механизма переноса сигнала на внутриклеточные ферментативные системы и их активации впоследствии, а также с увеличением количества рецепторов на поверхности клеток (Клебанов, Владимиров, 1999). Также, усиление кислородзависимого метаболизма может быть связано со стимуляцией митохондриальной активности под действием излучения (Yu et al., 1997; Dube et al., 2003). Таким образом, установленное нами повышение генерации АФК и снижение резервного потенциала клеток демонстрирует, что излучение плазмы разряда индуцирует не только фагоцитарную реакцию, но и способствует активации кислородзависимого метаболизма перитонеальных клеток.

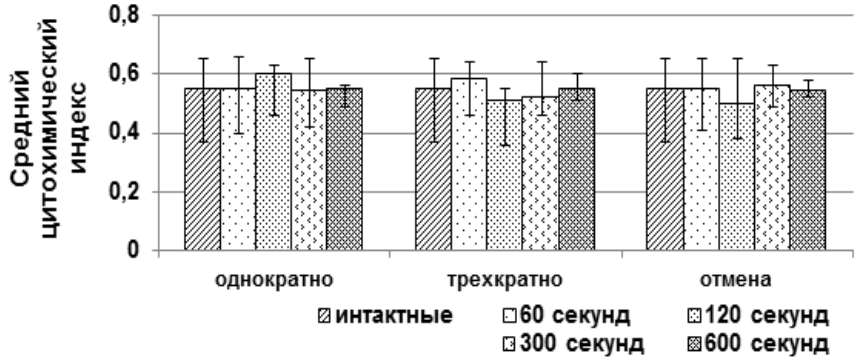

Рис. 16. Активность миелопероксидазы перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы. Графики представлены в виде Me ± 25-й и 75-й процентиль

Дополнительно исследована активность миелопероксидазы (МПО) перитонеальных клеток, которая является одним из механизмов в осуществлении полноценного фагоцитарного ответа и также участвует в процессах образования активных форм кислорода. Показано, что выбранные режимы воздействия не оказывают влияния на активность МПО (рис. 16).

Таким образом, установлено, что излучение плазмы разряда не нарушает функциональное состояние перитонеальных клеток в эксперименте *in vivo*. Сохраняется жизнеспособность клеток и не происходит активации процессов десиалирования плазматической мембраны. При этом усиливаются адгезивные свойства клеток, и происходит активация процессов фагоцитоза и кислородзависимого метаболизма, что указывает на стимулирующее действие излучения плазмы на перитонеальные клетки.

Результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы в статьях: Архипова Е.В. Воздействие некогерентного импульсного излучения на функциональное состояние мононуклеарных клеток в эксперименте / Архипова Е.В., Иванова И.П. // Современные технологии в медицине. – 2013. – Т.5, №1. – С. 27–31; 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные *in vitro* показывают, что кратковременные режимы (30, 60 и 300 с) воздействия излучением плазмы и УФ-излучением не влияют на количество и жизнеспособность мононуклеарных перитонеальных клеток. Длительные режимы воздействия (600 и 1200 с) излучением плазмы и УФ-излучением влияют на общее количество и жизнеспособность перитонеальных клеток, а также на параметры фазовых портретов: снижают вазовую высоту, увеличивают диаметр и площадь клеток, что свидетельствует о наличии цитотоксического эффекта, который связан с изменением структурного состояния клеток. При этом цитотоксический эффект УФ-излучения выражен в большей степени. С увеличением времени воздействия меняется липидный и фосфолипидный состав. Однако не наблюдается интенсификации процессов липопероксидации и не происходит накопления карбонильных производных белков, что указывает на то, что и излучение плазмы и УФ-излучение не приводят к развитию окислительного стресса. В тоже время, продемонстрировано, что излучение плазмы способствует более интенсивной модификации ароматических аминокислот: тирозина и триптофана, а накопление продуктов гликозилирования белков идет медленнее по сравнению с УФ-излучением. Тем не менее, наблюдаемая модификация белков не вызывает нарушения работы белков-ферментов, таких как СОД.

Излучение плазмы и УФ-излучение приводят к структурной реорганизации мембран перитонеальных клеток наиболее выраженной при длительных режимах воздействия. Установлено увеличение микровязкостных свойств клеток за счет уменьшения текучести в зоне липид-белковых и липид-липидных контактов, а также к изменению молекулярной организации жирных кислот фосфолипидов. При этом излучение плазмы и УФ-излучение приводят к разнонаправленным изменениям молекулярной организации мембранного гидрофобного углеводородного слоя мембран клеток: УФ-излучение уплотняет

фосфолипидный бислой и снижает проницаемость мембраны, а излучение плазмы искрового разряда разрыхляет бислой и увеличивает проницаемость перитонеальных клеток. Кроме того, наблюдаются процессы десиалирования клеточной поверхности после воздействия длительными режимами излучения плазмы и УФ-излучения.

Изменения в структурном состоянии мононуклеарных перитонеальных клеток влияет на их функциональную активность. Происходит увеличение адгезивной способности клеток при коротких режимах воздействия и снижение при длительных режимах. При этом излучение плазмы искрового разряда способствует более интенсивному снижению адгезии перитонеальных клеток. Адгезия фагоцитов сопровождается респираторным «взрывом», что подтверждается результатами по оценке люминолзависимой хемилюминисценции. При коротких режимах воздействия излучением плазмы происходит активация люминолзависимой хемилюминисценции как при спонтанном, так и при индуцированном варианте теста. При длительных режимах воздействия наблюдается тенденция к снижению хемилюминисценции. Но при этом время наступления «кислородного взрыва» сокращается после воздействия излучением плазмы, тогда, как УФ-излучение увеличивает время реакции в обоих вариантах теста. Кроме того, при длительных режимах воздействия снижается активность миелопероксидазы, которая является основной бактерицидной системой клеток, что может быть связано как с влиянием активных частиц, образующихся после генерации излучения, так и со снижением адгезивной способности.

Таким образом, в эксперименте *in vitro* показано, что при коротких режимах воздействия излучением плазмы наблюдается стимуляция функциональной активности перитонеальных клеток, а при длительных режимах воздействия наблюдается снижение функциональной активности. Предполагаемый механизм активации и снижения функциональной

активности клеток после воздействия излучением плазмы с учетом полученных результатов и литературных данных представлен на рисунке 17.

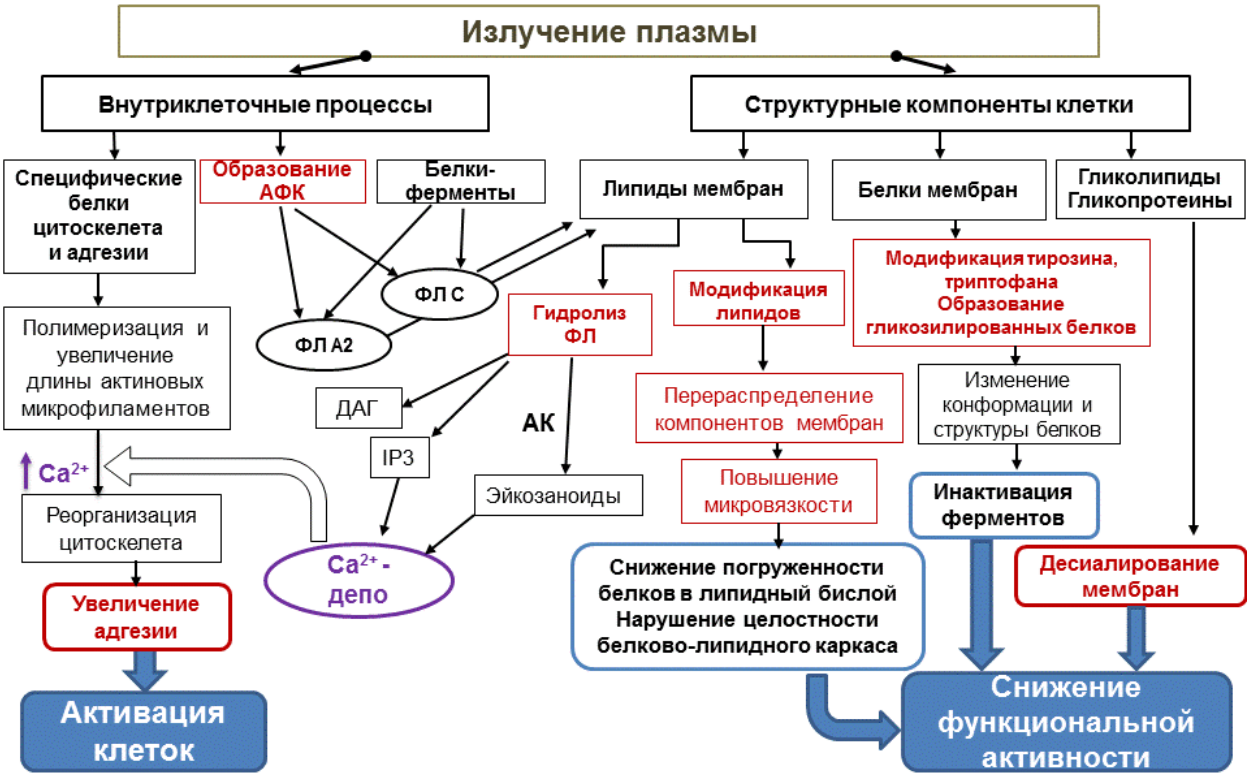

Рис. 17. Предполагаемый механизм активации и снижения функциональной активности перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы. АК – арахидоновая кислота, АФК – активные формы кислорода, ДАГ – диацилглицерол, ФЛ А2 – фосфолипаза А2, ФЛ С – фосфолипаза С, IP3 - инозитол-1,4,5-трифосфат. Примечание: красным цветом обозначены анализируемые параметры

Излучение плазмы действует на клетки, при этом осуществляется два варианта взаимодействия: действие непосредственно квантов излучения на мембрану и действие активных частиц на макромолекулы. В результате воздействия могут запускаться и активироваться следующие процессы: деполяризация мембраны в результате электрического пробоя мембран и изменения микровязкости; внутриклеточное образование небольших количеств АФК, которые выполняя роль вторичных мессенджеров могут активировать синтез белков, цитокинов, индуцировать прайминг клеток,

активировать рецепторы и ферменты клетки, в частности фосфолипазу А2 и фосфолипазу С; модификация белков и белков-рецепторов, что приводит к конформационным перестройкам белковых молекул, что является сигналом для специфических белков цитоскелета и адгезии, а также активирует фосфолипазу А2 и фосфолипазу С.

Воздействие на специфические белки адгезии приводит к полимеризации и увеличению длины актиновых микрофиламентов. Активация фосфолипазы А2 и фосфолипазы С вызывает гидролиз 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.

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.

При изучении влияния излучения плазмы в эксперименте *in vivo* показано, что не происходит нарушения функционального состояния перитонеальных клеток. Наблюдается возрастание адгезивных свойств клеток, активация процессов фагоцитоза и кислородзависимого метаболизма, что свидетельствует о стимулирующем действии излучения плазмы на 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%, поглотительную 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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абаленихина, Ю.В. Окислительная модификация белков тимуса крыс под влиянием меди в ультрадисперсной форме / Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина, Г.И. Чурилов, Ю.Н. Иванычева // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 11. – С. 1315 – 1319

2. Абаленихина, Ю.В. Состояние окислительной модификации тирозина и триптофана в условиях in vivo – модулирования синтеза оксида азота / Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина // Наука молодых. – 2016. – № 1. – С. 7 – 10

3. Агейченко, А.В. Липидный состав клеточных мембран эритроцитов при использовании гентамицина и профилактическом применении эмоксипина / А.В. Агейченко, В.А. Королёв, О.А. Медведева, О.В. Бобынцева, В.Н. Рыжаева // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2015. – № 4. – С. 65 – 68

4. Амиров, Р.Х. Динамика диссипации энергии в наносекундном коронном разряде / Р.Х. Амиров, Э.И. Асиновский, И.С. Самойлов // Теплофизика высоких температур. – 1991. – Т. 29, № 6. – С. 1053 – 1059

5. Ансари, Н.А. Неферментативное гликирование белков: от диабета до рака / Н.А. Ансари, З. Рашид // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, № 2. – С. 168 – 178

6. Артюхов, В.Г. Влияние УФ-света на синтез некоторых белков лимфоцитами / В.Г. Артюхов, О.В. Башарина, И.Е. Савостина // Иммунология. – 2009. – № 3. – С. 152 – 154

7. Артюхов, В.Г. Влияние УФ-света на субпопуляционный состав и экспрессию мембранных маркеров лимфоцитов крови человека / В.Г. Артюхов, О.В. Башарина, О.В. Зимченкова, С.В. Рязанцев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2016. – Т. 56, № 1. – С. 73 – 81

8. Артюхов, В.Г. Современные представления о механизмах действия ультрафиолетового излучения на клетки и субклеточные системы / В.Г. Артюхов, О.В. Башарина // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2021. – № 1. – С. 54 – 68

9. Артюхов, В.Г. Изменения уровня экспрессии ряда поверхностных молекул лимфоцитов крови человека в условиях УФ-облучения их суспензий / В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, С.М. Дубова, В.А. Брагина // Медицинская иммунология. – 2013. – Т. 15, № 4. – С. 361 – 368

10. Артюхов, В.Г. Фрагментация ДНК лимфоцитов человека в динамике развития апоптоза, индуцированного воздействием УФ-излучения и активных форм кислорода. / В.Г. Артюхов, М.С. Трубицина, М.А. Наквасина, Е.В. Соловьева // Цитология. – 2011. – Т. 53, № 1. – С. 61 – 67

11. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации / А.В Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н Зыбина. – СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. – 104 с.

12. Астафьева, К.А. Анализ цитотоксического действия медицинских газоразрядных устройств / К.А. Астафьева, И.П. Иванова // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 115 – 122

13. Базелян, Э.М. Искровой разряд / Э.М. Базелян, Ю.П. Райзер. – М.: МФТИ, 1997. – 320 с.

14. Барышева, С.В. Морфофункциональные особенности перитонеальных макрофагов у животных с экспериментальным гепатитом / С.В. Барышева, Г.В. Брюхин // Вестник Челябинского государственного университета. – 2008. – № 4. – С. 60 – 64

15. Бехало, В.А. Роль ультрафиолетового облучения и оксида азота в регуляции воспаления и апоптоза / В.А. Бехало, Е.В. Сысолятина, Е.В. Нагурская // Иммунология. – 2009. – № 4. – С. 237 – 241

16. Биологическая химия / под ред. А.Я. Николаева – 3-е изд. – М.: МИА, 2004. – 559 с.

17. Биофизика / под ред. В.Г. Артюхова. – М.: Академический проект, 2013. – 294 с.

18. Блиндарь, В.Н. Функциональная характеристика зрелых нейтрофилов периферической крови больных хроническим миелолейкозом / В.Н. Блиндарь, Г.Н. Зубрихина, И.Н. Михайлова, Е.С. Захарова, Т.Н. Заботина, А.Г. Туркина,

Н.Д. Хорошко, О.М. Вотякова, М.А. Волкова, А.Ю. Барышников // Гематология и трансфузиология. – 2002. – Т. 47, № 2. – С. 13 – 16

19. Брюхин, Г.В. Сравнительная характеристика цитохимического состояния перитонеальных и альвеолярных макрофагов потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени / Г.В. Брюхин, Е.Ю. Шаврина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, № 5. – С. 551 – 554

20. Булыгин, Г.В. Изменение активности ферментов и показателей липидного состава лимфоцитов детей, больных хроническим вирусным гепатитом В / Г.В. Булыгин, Н.А. Аксенова // Сибирское медицинское обозрение. – 2010. – № 2. – С. 33 – 36

21. Булыгин, Г.В. Липидный спектр лимфоцитов крови больных ревматоидным артритом / Г.В. Булыгин, М.В. Кишиневский, Т.Ю. Большакова, Л.М. Шкиль // Сибирский медицинский журнал. – 2001. – № 5. – С. 28 – 32

22. Веснина, Л.Э. Липидные рафты: роль в регуляции функционального состояния клеточных мембран / Л.Э. Веснина // ВІСНИК ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». – 2013. – Т. 3, № 2. – С. 5 – 10

23. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341 – 388

24. Власова, И.И. pH-зависимая регуляция активности миелопероксидазы / И.И. Власова, Ю. Арнхольд, А.Н. Осипов, О.М. Панасенко // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 6. – С. 825 – 837

25. Волыхина, В.Е. Супероксиддисмутаза: структура и свойства / В.Е. Волыхина, Е.В. Шафрановская // Вестник ВГМУ. – 2009. – Т. 8, № 4. – С. 1 – 18

26. Гавриленко, Т.И. Миелопероксидаза и ее роль в развитии ишемической болезни сердца / Т.И. Гавриленко, Н.А. Рыжкова, А.Н. Пархоменко // Український кардіологічний журнал. – 2014. – № 4. – С. 119 – 126

27. Гайнитдинова, В.В. Сила адгезии, жесткость мембраны нейтрофилов и биомаркеры системного воспаления у больных хронической обструктивной

болезнью легких с легочной гипертензией / В.В. Гайнитдинова, Л.А. Шарафутдинова, И.М. Камалтдинов, С.Н. Авдеев // Пульмонология. – 2014. – № 6. – С. 33 – 39

28. Дубинина, Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров. Д.А. Ходов, И.Г. Поротов // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24 – 26

29. Дубинина, Е.Е. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование в очищенных белках с использованием системы Фентона / Е.Е. Дубинина, С.В. Гавровская, Е.В. Кузьмич, Н.В. Леонова, М.Г. Морозова, С.В. Ковругина, Т.А. Смирнова // Биохимия. – 2002. – Т. 67. – С. 413 – 421

30. Есимова, И.Е. Микровязкость и липидный спектр мембраны мононуклеарных лейкоцитов крови у больных туберкулезом легких / И.Е. Есимова, В.В. Новицкий, О.И. Уразова, А.К. Стрелис, О.В. Воронкова, Р.Р. Хасанова // Сибирский медицинский журнал. – 2006. – № 8. – С. 15 – 18

31. Есимова, И.Е. Причины дисрегуляци иммунного ответа при туберкулезе легких: роль нарушений исходного состояния иммунологической реактивности организма / И.Е. Есимова, В.В. Новицкий, О.И. Уразова, Р.Р. Хасанова, А.А. Кошкина, Е.Г. Чурина // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 4. – С. 93 – 99

32. Загубиженко, М.В. Использование метода лазерной интерференционной микроскопии для исследования состояния перитонеальных макрофагов мыши, облученных ультрафиолетовым Б-светом / М.В. Загубиженко, А.И. Юсипович, С.К. Пирутин, В.Л. Минаев, Ю.Б. Кудряшов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51, № 6. – С. 715 – 720

33. Заславская, М.И. Фунгицидный эффект некогерентного импульсного излучения при экспериментальном оральном кандидозе крыс / М.И. Заславская, И.П. Иванова // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т. 6. – С. 285 – 286

34. Захарян, Г.В. Исследование содержания N-ацетилнейраминовых кислот при экспериментальном отеке головного мозга / Г.В. Захарян // Биологический журнал Армении. – 2012. – Т. 64, № 2. – С. 35 – 38

35. Зубова, С.Г. Роль молекул адгезии в процессе распознавания чужеродных и трансформированных клеток макрофагами млекопитающих / С.Г. Зубова, В.Б. Окулов // Успехи современной биологии. – 2001. – Т. 121, № 1. – С. 59 – 66

36. 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

37. Иванова, И.П. Биоцидный эффект некогерентного импульсного излучения искрового разряда в экспериментах in vitro и in vivo / И.П. Иванова, М.И. Заславская // Современные технологии в медицине. – 2009. – № 1. – С. 28 – 31

38. Иванова, И.П. Влияние активных форм кислорода низкотемпературной газоразрядной плазмы на резистентность мембран клеток / И.П. Иванова, С.В. Трофимова, И.М. Пискарев, Д.И. Князев, А.В. Тимуш, О.Е. Бурхина, Л.Г. Литвинова // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2011. – Т. 2, № 2. – С. 190 – 195

39. Иванова, И.П. Влияние высокоэнергетических импульсных воздействий на свободнорадикальные процессы и важнейшие физиологические системы организма интактных и опухолевых животных: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук: 03.00.13., 16.00.02. / Иванова Ирина Павловна. – Н. Новгород, 2006. – 317 с.

40. Иванова, И.П. Влияние излучения плазмы искрового разряда на модификацию белков и липидов / И.П. Иванова, С.В. Трофимова, И.М. Пискарев, А.А. Ичеткина, О.Е. Бурхина, В.А. Сысоева // Фундаментальные исследования. – 2013. – №1. – С. 572 – 575

41. Иванова, И.П. Оценка механизмов цитотоксического действия излучения газоразрядной плазмы / И.П. Иванова, С.В. Трофимова, М.В. Ведунова, А.С. Жаберева, М.Л. Бугрова, И.М. Пискарев, Н. Карпель Вель Лейтнер // Современные технологии в медицине. – 2014. – Т. 6, № 1. – С. 14 – 22

42. Изикаев, В.М. Исследование фагоцитоза и кислородзависимого метаболизма перитонеальных макрофагов мышей после воздействия сокультивируемых бактерий enterobacter cloacae и staphylococcus aureus / В.М. Изикаев, З.Г. Габидуллин, А.А. Ахтариева, Р.С. Суфияров, Р.Р. Суфияров, А.А. Камалова, Ю.З. Габидулин // Медицинский вестник Башкортостана. – 2011. – Т. 6, № 1. – С. 92 – 95

43. Изикаев, В.М. Сравнительное изучение функциональной активности перитонеальных макрофагов мышей при экспериментальной моно – и микст – инфекции / В.М. Изикаев, З.Г. Габидуллин, А.А. Ахтариева, Р.С. Суфияров, Р.Р. Суфияров, А.А. Камалова, Ю.З. Габидулин, А.Р. Гайсина // Медицинский вестник Башкортостана. – 2011. – Т. 6, № 4. – С. 110 – 114

44. Ичеткина, А.А. Влияние ультрафиолетового излучения и излучения плазмы импульсного искрового разряда на зародышевые структуры и мицелий микромицетов-деструкторов / А.А. Ичеткина, С.В. Трофимова, Д.В. Кряжев, И.П. Иванова, В.Ф. Смирнов // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2011. – Т. 2, № 2. – С. 196 – 201

45. Кейтс, М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. – М: МИР, 1975. – 322 с.

46. Киселев, О.И. Структурно-метаболические характеристики клеток и их функциональные возможности / О.И. Киселев, И.В. Сергеева, Т.В. Сологуб, Е.П. Тихонова, Г.В. Булыгин // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2015. – Т. 20, № 5. – С. 52 – 56

47. Клебанов, Г.И. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения красного диапазона на активность супероксиддисмутазы макрофагов / Г.И.

Клебанов, Е.А. Полтанов, Ю.А. Владимиров // Биофизика. – 2003. – Т. 48, № 3. – С. 462 – 473

48. Клебанов, Г.И. Клеточные механизмы прайминга и активации фагоцитов / Г.И. Клебанов, Ю.А. Владимиров // Успехи современной биологии. – 1999. – Т. 119, № 5. – С. 462 – 475

49. Клеменова, И.А. Клинико-патогенетическая роль структурно-функциональной организации плазматических мембран при псориазе: Автореферат диссертации на соискание степени доктора биологических наук. – Москва, 2008. – 42 с.

50. Клинико-диагностическое значение исследования активности супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы. Методическое пособие для практических врачей / под ред. И.А. Зборовской, М.В. Мякишева. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2004. – 12 с.

51. Клиническая лабораторная аналитика / под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Лабинформ-РАМЛД, 1999. – 352 с.

52. Крюков, А.А. Генерация активных форм кислорода в моноцитах при адгезии к стеклу / А.А. Крюков, Г.Н. Семенкова, С.Н. Черенкевич // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 2. – С. 142 – 148

53. Кулинский, В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред, защита / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 2 – 7

54. Лебедева, А.М. Изменения активности адгезии моноцитов к эндотелиальным клеткам под влиянием компонентов Streptococcus pyogenes / А.М. Лебедева, Э.А. Старикова, Л.А. Бурова, И.С. Фрейдлин // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13, № 6. – С. 581 – 588

55. Лимфоциты: Методы. (пер. с англ.) / под ред. Дж. Клауса – М.: Мир, 1990. – 394 с.

56. Лямина, С.В. Поляризация макрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа / С.В. Лямина, И.Ю. Малышев // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10. – С. 930 – 935

57. Маслов, А.К. Роль пероксидазы в патогенезе заболеваний и реализация ее фармакологической активности на примере экспериментальной лепры / А.К. Маслов // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – Т. 14, № 4. – С. 161 – 164

58. Маянский, А.Н. НАДФН-оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция / А.Н. Маянский // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 3–13

59. Маянский, А.Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: Методические рекомендации / А.Н. Маянский, М.К. Винсман. – Казань, 1979. – 11 с.

60. Маянский, Д.Н. Диагностическая ценность лейкоцитарных тестов. Определение биоцидности лейкоцитов: Методические рекомендации / Д.Н. Маянский, Д.Д. Цырендоржиев, О.П. Макарова, С.Н. Кутина, А.А. Зубахин, Н.Н. Маянская, С.Д. Маянская, А.В. Мышкин, Е.П. Сергеева, Т.В. Даниличева. – Новосибирск: Типография СО РАМН, 1996. – 32 с.

61. Меньшикова, И.А. Влияние дихлорэтана на микробиоцидную активность нейтрофилов и мононуклеарных фагоцитов / И.А. Меньшикова, Н.А. Муфазалова, Ф.Х. Камилов, Л.Ф. Муфазалова // Казанский медицинский журнал. – 2017. – Т. 98, № 3. С. – 415 – 418

62. Мирошниченко, С.М. Морфофункциональные показатели перитонеальных макрофагов различных линий мышей при асептическом воспалении / С.М. Мирошниченко, Г.А. Коваленко, Г.С. Русских, О.Н. Потеряева, Л.Е. Панин // Бюллетень СО РАМН. – 2014. – Т. 34, № 1. – С. 27 – 32

63. Митрошина, Е.В. Определение жизнеспособности клеточных культур. Учебно-методическое пособие / Е.В. Митрошина, Т.А. Мищенко, М.В. Ведунова. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2015. – 27 с.

64. Молотковский, Юл.Г. Флуоресцентные липидные зонды: свойства и применение / Юл.Г. Молотковский // Биоорганическая химия. – 1999. – Т. 25, № 11. – С. 855 – 867

65. Муравлева, Л.Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Клюев, Р.А. Бакенова, Б.Ж. Култанов, Н.А. Танкибаева, В.В. Койков, Г.А. Омарова // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 1. – С. 74 – 78

66. Образцов, И.В. Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двухстадийной стимуляции: новый подход к хемилюминесцентному анализу / И.В. Образцов, М.А. Годков, А.М. Полимова, Е.М. Дёмин, Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9, № 4. – С. 418 – 425

67. Олиферук, Н.С. Оценка фагоцитарной и бактерицидной активности нейтрофилов и макрофагов / Н.С. Олиферук, А.Н. Ильинская, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 2005. – № 1. – С. 10 – 12

68. Петренёв, Д.Р. Перитонеальные клетки перитонеальной полости крыс как система для моделирования ответов иммунной системы на действие радиационного фактора / Д.Р. Петренёв // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL: http://www.irb.basnet.by/ru/peritonealnye-kletki-peritonealnoj-polosti-krys-kak-sistema-dlya-modelirovaniya-otvetov-immunnoj-sistemy-na-dejstvie-radiacionnogo-faktora/ 2017, Март

69. Пинегин, Б.В. Макрофаги: свойства и функции / Б.В. Пинегин, М.И. Краснова // Иммунология. – 2009. – № 4. – С. 241 – 249

70. Пирутин, С.К. Влияние ионов водорода на фоточувствительность мембран перитонеальных макрофагов / С.К. Пирутин, В.Б. Туровецкий, Ю.Б. Кудряшов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т. 49, № 1. – С. 113 – 116

71. Пирутин, С.К. Изменение внутриклеточного pH макрофагов после УФ-облучения / С.К. Пирутин, В.Б. Туровецкий, А.Б. Дружко, Ю.Б. Кудряшов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2004. – Т. 44, № 6. – С. 681 – 683

72. Пирутин, С.К. Изменение УФ-чувствительности плазматических мембран перитонеальных макрофагов под влиянием ионов кальция / С.К. Пирутин, В.Б. Туровецкий, Ю.Б. Кудряшов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51, № 4. – С. 419 – 424

73. Пирутин, С.К. Повреждение мембран макрофагов при воздействии средневолнового ультрафиолетового излучения / С.К. Пирутин, В.Б. Туровецкий, Ю.Б. Кудряшов, А.Б. Рубин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42, № 2. – С. 147 – 150

74. Пискарев, И.М. Инициирование и исследование свободнорадикальных процессов в биологических экспериментах: монография / И.М. Пискарев, И.П. Иванова, А.Г. Самоделкин, М.Н. Иващенко. – Н.Новгород: ФГБОУ ВО Нижегородская ГСХА, 2016. – 140 с.

75. Пискарев, И.М. Источник излучения плазмы на основе искрового разряд на воздухе для биомедицинских исследований / И.М. Пискарев, И.П. Иванова, С.В. Трофимова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – №10. – С. 12 – 16

76. Пискарев, И.М. Образование пероксинитрита под действием излучения плазмы искрового разряда / И.М. Пискарев, И.П. Иванова, С.В. Трофимова, А.А. Ичеткина, О.Е. Бурхина // Химия высоких энергий. – 2014. – Т. 48, № 3. – С. 253 – 256

77. Пискарев, И.М. Окислительно-восстановительные процессы в растворе альбумина под действием УФ-излучения и излучения плазмы искрового разряда / И.М. Пискарев, И.П. Иванова, С.В. Трофимова, О.Е. Бурхина // Химия высоких энергий. – 2015. – Т. 49, № 1. – С. 76 – 80

78. Пискарев, И.М. Сравнение химических эффектов УФ-излучения искрового разряда на воздухе и ртутной лампы низкого давления / И.М. Пискарев, И.П. Иванова, С.В Трофимова // Химия высоких энергий. – 2013. – Т. 47, № 5. – С. 376 – 380

79. Пискарев, И.М. Химические эффекты самостоятельного искрового разряда. Моделирование процессов в жидкости / И.М. Пискарев, И.П. Иванова, С.В. Трофимова // Химия высоких энергий. – 2013. – Т. 47, № 2. – С. 152 – 156

80. Полежаева, Т.В. Влияние факторов различной природы на степень активности НАДФН-оксидазы нейтрофилов крови человека / Т.В. Полежаева, О.О. Зайцева, А.Н. Худяков, О.Н. Соломина, И.Г. Патурова, С.В. Утемов // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2. – С. 2170 – 2173

81. Практикум по имммунологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / под ред. И.А. Кондратьевой, А.А. Ярилина – 2-е изд., испр. и доп. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 272 с.

82. Пшежецкий, А.В. Десиалирование поверхностных рецепторов: новое направление в регуляции клеточных сигнальных систем / А.В. Пшежецкий, Л.И. Ашмарина // Биохимия. – 2013. – Т. 78, № 7. – С. 949 – 961

83. Райкова, С.В. Влияние электромагнитных волн терагерцового диапазона на частотах оксида азота на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов белых мышей / С.В. Райкова, Е.А. Пронина, Г.М. Шуб // Иммунология. – 2009. – № 5. – С. 270 – 272

84. Реброва, Т.Ю. Возрастзависимые особенности микровязкости мембран эритроцитов при экспериментальном кардиосклерозе / Т.Ю. Реброва, С.А. Афанасьев, О.Д. Путрова, С.В. Попов // Успехи геронтологии. – 2012. – Т.25, № 4. – С. 644 – 647

85. Реутов, В.П. Активность нейтрофилов крови и перитонеальных макрофагов в процессе развития опухолей у мышей: возможная роль активных форм кислорода и оксида азота / В.П. Реутов, В.П. Дерягина, Н.И. Рыжова, И.С. Голубева // Евразийское Научное Объединение. – 2016. – Т. 1, № 1. – С. 64 – 69

86. Рогалева, А.В. Активность свободнорадикального окисления и антиокидантной системы в лимфоцитах периферической крови у больных аутоиммунным тиреотитом / А.В. Рогалева, О.И. Уразова, Е.Б. Кравец, В.В. Новицкий, Н.А. Сухаленцева, О.И. Иванова, Е.Э. Энгель // Вестник российской АМН. – 2010. – № 3. – С. 11 – 15

87. Романюха, А.А. Иммунная система: норма и адаптация / А.А. Романюха // Иммунология. – 2009. – № 1. – С. 7 – 13

88. Рощупкин, Д.И. Биофизика органов / Д.И. Рощупкин, Е.Е. Фесенко, В.И. Новоселов. – М.: Наука, 2000. – 255 с.

89. Рощупкин, Д.И. Усиленная люминолом хемилюминесценция полиморфноядерных лейкоцитов кролика: природа оксидантов, непосредственно вызывающих окисление лиминола / Д.И. Рощупкин, Н.С. Белакина, М.А. Мурина // Биофизика. – 2006. – Т. 51, № 1 – С. 99 – 107

90. Рудик, Д.В. Влияние низко-интенсивного лазерного излучения на активность процесса фагоцитоза / Д.В. Рудик, Е.И. Тихомирова, И.О. Бугаева // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL:http://www.ikar.udm.ru/sb/sb27-1.htm 2002

91. Рязанцева, Л.Т. Миелопероксидаза: структурно-функциональные модификации и роль субъединичных контактов / Л.Т. Рязанцева // Вестник воронежского государственного технического университета. – 2009. – Т.5, № 9. – С. 85 – 88

92. Салмин, В.В. Влияние импульсного ультрафиолетового лазерного излучения на функциональную активность макрофагов / В.В. Салмин, Д.П. Скомороха, М.Ю. Реушев, О.В. Фролова, Н.А. Малиновская, О.Л.Лопатина, А.Б. Салмина // Сибирское медицинское обозрение. – 2014. – № 4. – С. 39 – 44

93. Самойлова, А.А. Измерение микровязкости мембран эритроцитов методом латеральной диффузии гидрофобного зонда пирена: Методическая Разработка. / А.А. Самойлова. – Красноярск: Краснояр. гос. ун-т, 2006. – 10 с.

94. Сарбаева, Н.Н. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами / Н.Н. Сарбаева, Ю.В. Пономарева, М.Н. Милякова // Гены и Клетки. – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 9 – 17

95. Творогова, М.Г. Определение липидного состава липопротеидов высокой плотности методом тонкослойной хроматографии на силикагеле / М.Г. Творогова, Е.Л. Исаева, Н.В. Проказова, Т.А. Рожкова, В.В. Кухарчук, В.Н. Титов // Клиническая лабораторная диагностика. – 1998. – № 4. – С. 13 – 16

96. Токтоматова, А.Н. Фосфолипидная структура клеточных мембран при привычном невынашивании беременности у женщин / А.Н. Токтоматова, А.О. Атыканов // Вестник КРСУ. – 2013. – Т. 13, № 11. – С. 156 – 158

97. Толочко, З.С. Окислительная модификация белков в крови крыс при повреждении капсаицин чувствительных нервов и изменении уровня оксида азота / З.С. Толочко, В.К. Спиридонов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2010. – Т. 96, № 1. – С. 77 – 84

98. Тюнина О.И., Исследование механизмов действия монооксида углерода и УФ-света на структурно-функциональное состояние лимфоцитов и эритроцитов крови человека: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.01.02. / Тюнина Ольга Ивановна. – Воронеж, 2015. – 175 с.

99. Федоров, Г.Н. Особенности хемилюминесценции цельной разведенной крови / Г.Н. Федоров, С.Д. Леонов // Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал. – 2007. – Т. 6, № 4. – С. 15 – 18

100. Фефелова, Ю.А. Конституциональная обусловленность внутрисистемных корреляционных связей липидного состава мембран лимфоцитов крови у девушек 16-20 лет при пищевой нагрузке / Ю.А. Фефелова, В.В. Фефелова, Т.В. Казакова, Е.Ю. Сергеева, Т.П. Колоскова // Сибирское медицинское обозрение. – 2013. – № 6. – С. 33 – 37

101. Фотобиофизика. Версия 1.0 электрон.учеб. пособие / И.Е. Суковатая, В.А. Кратасюк, В.В. Межевикин, И.В. Свидерская, Е.Н. Есимбекова, Е.В. Немцева // [Электронный ресурс]: Режим доступа: URL:http://files.lib.sfu-kras.ru/ebibl/umkd/141/u_course.pdf – Красноярск: ИПК СФУ, 2008.

102. Хабибуллин, Р.Р. Теоретические и практические аспекты процесса люминолзависимой хемилюминесценции в живых организмах / Р.Р. Хабибуллин, А.В. Федосов // Башкирский химический журнал. – 2006. – Т. 13, № 2. – С. 106 – 107

103. Хаитов, Р.М. Иммунология: учебник для студентов / Р.М. Хаитов – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 528 с.

104. Часовских, Н.Ю. Апоптоз и окислительный стресс / Н.Ю. Часовских, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий. – Томск: Печ. мануфактура, 2009. – 148 с.

105. Чекнев, С.Б. Активные метаболиты кислорода в обеспечении и контроле естественных цитотоксических реакций / С.Б. Чекнев // Весник РАМН. – 1999. – № 2. – С. 15 – 22

106. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. Ч. 2 / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. – в 2-х частях. – М: МИР, 1980. – 621 с.

107. Шишкина, Л.Н. Липиды эритроцитов крови и их функциональная активность / Л.Н. Шишкина, О.Г. Шевченко // Успехи современной биологии. – 2010. – Т. 130, № 6. – С. 587 – 602

108. Шопова А.В. Фагоцитарная активность и ловушкообразующая способность макрофагов различных компартментов у потомства самок крыс с лекарственным поражением печени: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.03.04. / Шопова Анастасия Валерьевна. – Челябинск, 2015. – 235 с.

109. Ягода, А.В. Клиническая цитохимия / А.В. Ягода, Н.А. Локтев. – Ставрополь, 2005. – 485 с.

110. Ярмолюк, Н.С. Протеазная активность альвеолярных макрофагов при комбинированном действии факторов различной природы / Н.С. Ярмолюк, А.С. Костюк, К.Н. Туманянц // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Биология, химия. – 2008. – Т. 21, № 2. – С. 172 – 181

111. Araujo, T.H. Intracellular localization of myeloperoxidase in murine peritoneal B-lymphocytes and macrophages / T.H. Araujo, S.S. Okada, E.E. Ghosn, N.N. Taniwaki, M.R. Rodrigues, S.R. Almeida, R.A. Mortara, M. Russo, A. Campa, R.C. Albuquerque // Cellular Immunology. – 2013. – Vol. 281. – P. 27 – 30

112. Attri, P. Influence of reactive species on the modification of biomolecules generated from the soft plasma / P. Attri, N. Kumar, J.H. Park, D.K. Yadav, S. Choi, H.S. Uhm, I.T. Kim, E.H. Choi, W. Lee // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5. – P. 1 – 12

113. Babior, B.M. NADPH Oxidase: An Update / B.M. Babior // Blood. – 1999. – Vol. 93, № 5. – P. 1464 – 1476

114. Bershadsky, A. Adhesion-mediated mechanosensitivity a time to experiment and a time to theorize / A. Bershadsky, M. Kozlov, B. Geiger // Current opinion in cell biology. – 2006. – Vol. 18. – P. 472 – 481

115. Bowdish, D.M. MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to Mycobacterial trehalose dimycolate and Mycobacterium tuberculosis / D.M. Bowdish, K. Sakamoto, M.J. Kim, M. Kroos, S. Mukhopadhyay, C.A. Leifer, K. Tryggvason, S. Gordon, D.G. Russell // PLoS Pathogens. – 2009. – Vol. 5, № 6. – P. 1 – 14

116. Brechard, S. New insights into the regulation of neutrophil NADPH oxidase activity in the phagosome: a focus on the role of lipid and Ca (2+) signaling / S. Brechard, S. Plancon, E.J. Tschirhart // Antioxid Redox Signal. – 2013. – Vol. 18. – P. 661 – 676

117. Canto, A. Diphenylhexatriene membrane probes DPH and TMA-DPH: Acomparative molecular dynamics simulation study / A. Canto, J.R. Robalo, P.D. Santos, A.J. Carvalho // Biochimica et Biophysica Acta. – 2016. – Vol. 11. – P. 2647 – 2661

118. Chen, Z. A Novel Micro Cold Atmospheric Plasma Device for Glioblastoma Both In Vitro and In Vivo / Z. Chen, H. Simonyan, X. Cheng, E. Gjika, L. Lin, J. Canady, J.H. Sherman, C. Young, M. Keidar // Cancers. – 2017. – Vol. 9, № 6. – P. 1 – 16

119. Choi, J.W. Novel Therapeutic Effects of Non-thermal atmospheric pressure plasma for Muscle Regeneration and Differentiation / J.W. Choi, S.U. Kang, Y.E. Kim, J.K. Park, S.S. Yang, Y.S. Kim, Y.S. Lee, Y. Lee, C.H. Kim // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – P. 1 – 11

120. Ciobanasu, C. Actin dynamics associated with focal adhesions / C. Ciobanasu, B. Faivre, C. Le Clainche // International Journal of Cell Biology. – 2012. – Vol. 2012, ID 941292

121. Clydesdale, G.J. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects / G.J. Clydesdale, G.W. Dandie, H.K. Muller // Immunology and cell biology. – 2001. – Vol. 79. – P. 547 – 568

122. Colak, E. New markers of oxidative damage to macromolecules / E. Colak // Journal of Molecular Biology. – 2008. – Vol. 27, № 1. – P. 3 – 16

123. Daeschlein, G. Skin and wound decontamination of multidrug-resistant bacteria by cold atmospheric plasma coagulation / G. Daeschlein, M. Napp, S. Lutze, A. Arnold, S. Podewils, D. Guembel, M. Jünger // Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft – 2015. – Vol. 13. – P. 143 – 149

124. Dai, H. Ammonia-induced Na,K-ATPase / ouabain-mediated EGF receptor transactivation, MAPK/ERK and PI3K/AKT signaling and ROS formation cause astrocyte swelling / H. Dai, D. Song, J. Xu, B. Li, L. Hertz, L. Peng // Neurochemistry International. – 2013. – Vol. 63, № 6. – P. 610 – 625

125. Dalle-Donne, I. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress / I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, R. Colombo // Clinica Chimica Acta. – 2003. – Vol. 329. – P. 23 – 38

126. Davies, K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects / K.J. Davies // Journal of Biological Chemistry – 1987. – Vol. 262, № 20. – P. 9895 – 9901

127. Dawaliby, R. Phosphatidylethanolamine Is a Key Regulator of Membrane Fluidity in Eukaryotic Cells / R. Dawaliby, C. Trubbia, C. Delporte, C. Noyon, J. Ruysschaert, P.V. Antwerpen, C. Govaerts // Journal of Biological Chemistry. – 2016. – Vol. 291, № 7. – P. 3658 – 3667

128. DeMeyer, F. Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer / F. De Meyer, B. Smit // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2009. – Vol. 106, № 10. – P. 3654 – 3658

129. Dean, R.T. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation / R.T. Dean, S. Fu, R. Stocker, M.J. Davies // Biochemical Journal. – 1997. – Vol. 324. – P. 1 – 18

130. Dobrynin, D. Cold Plasma Sterilization of Open Wounds: Live Rat Model / D. Dobrynin, K. Wasko, G. Fridman, A. Friedman, G. Friedman // Plasma Medicine. – 2011. – Vol. 1, № 2. – P. 109 – 114

131. Dobrynin, D. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue / D. Dobrynin, G. Fridman, G. Friedman, A. Friedman // New Journal of Physics. – 2009. – Vol. 11. – P. 1 – 26

132. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Droge // Physiological Reviews. – 2002. – Vol. 82. – P. 47 – 95

133. Dube, A. Modulation of macrophage structure and function by low level He–Ne laser irradiation / A. Dube, H. Bansal, P.K. Gupta // Photochemical and Photobiological Sciences. – 2003. Vol. 2. – P. 851 – 855

134. Durant, S.T. UV radiation induces delayed hyperrecombination associated with hypermutation in human cells / S.T. Durant, K.S. Paffett, M. Shrivastav, G.S. Timmins, W.F. Morgan, J.A. Nickoloff // Molecular and Cellular Biology. – 2006. – Vol. 26. – P. 6047 – 6055

135. Duthie, M.S. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system / M.S. Duthie, I. Kimber, M. Norval // British Journal of Dermatology. – 1999. – Vol. 140. – P. 995 – 1009.

136. Erdem, M. Joint immobilization increases reactive oxygen species: an experimental study / M. Erdem, T. Günes, C. Sen, B. Bostan, H. Aslan, H. Ozyurt, R.D. Köseoglu // Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica. – 2009. – Vol. 43, № 5. – P. 436 – 443

137. Fletcher, D.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological system and tissues / D.L. Fletcher, C.J. Dillared, A.Y. Tappel // Analytical Biochemistry. – 1973. – Vol. 52. – P. 497 – 499

138. Flynn, P.B. Non-thermal Plasma Exposure Rapidly Attenuates Bacterial AHL-Dependent Quorum Sensing and Virulence / P.B. Flynn, A. Busetti, E.

Wielogorska, O.P. Chevallier, C.T. Elliott, G. Laverty, S.P. Gorman, W.G. Graham, B.F. Gilmore // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – P. 1 – 13

139. Folch, P.J. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue / P.J. Folch, M. Lees, G. Stanley // Journal of Biological Chemistry. – 1957. – Vol. 226. – P. 497 – 509

140. Fridman, G. Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines / G. Fridman, A. Shereshevsky, M.M. Jost, A.D. Brooks, A. Fridman, A. Gutsol, V. Vasilets, G. Friedman // Plasma Chemistry and Plasma Processing. – 2007. – Vol. 27. – P. 163 – 176

141. Friedman, G. Applied plasma medicine / G. Friedman, G. Friedman, A. Gutsol, A.B. Shekhter, V.N. Vasilets, A. Fridman // Plasma Processes and Polymers. – 2008. – Vol. 5. – P. 503 – 533

142. Friedman, P.C. Cold atmospheric pressure (physical) plasma in dermatology: where are we today? / P.C. Friedman // International Journal of Dermatology. – 2020. – Vol. 59, № 10. – P. 1171 – 1184

143. Gajate, C. Involvement of mitochondria and recruitment of Fas/CD95 signaling in lipid rafts in resveratrol-mediated antimyeloma and antileukemia actions / C. Gajate, F. Gonzalez-Camacho, F. Mollinedo // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2009. – Vol. 380. – P. 780 – 784

144. Giulivi, C. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance / C. Giulivi, N.J. Traaseth, K.J. Davies // Amino Acids. – 2003. – Vol. 25. – P. 227 – 232

145. Gjomarkaj, M. Phenotypic and Functional Characterization of Normal Rat Pleural Macrophages in Comparison with Autologous Peritoneal and Alveolar Macrophages / M. Gjomarkaj, E. Pace, M. Melis, M. Spatafora, M. Profita, A.M. Vignola, G. Bonsignore, G.B. Toews // American journal of respiratory cell and molecular biology. – 1999. – Vol. 20. – P. 135 – 142

146. Goswami, K. Level of sialic acid residues in platelet proteins in diabetes, aging, and Hodgkins lymphoma: a potential role of free radicals in desialylation / K.

Goswami, B.C. Koner // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2002. – Vol. 297. – P. 502 – 505

147. Greaves, D. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors / D. Greaves, S. Gordon // Journal of Lipid Research. – 2005. – Vol. 46, № 1. – P. 11 – 20

148. Hammer, M.U. Influence of Plasma Treatment on the Structure and Function of Lipids / M.U. Hammer, E. Forbrig, S. Kupsch, K.-D. Weltmann, S. Reuter // Plasma Medicine. – 2013. – Vol. 3, № 1 – 2. – P. 97 – 114

149. Hirano, Y. Singlet oxygen generated by a new nonthermal atmospheric pressure air plasma device exerts a bactericidal effect on oral pathogens / Y. Hirano, M. Hayashi, M. Tamura, F. Yoshino, A. Yoshida, M. Masubuchi, K. Imai, B. Ogiso // Journal of Oral Science. – 2019. – Vol. 61, № 4. - P. 521 – 525

150. Hixon, J. Algorithm for the Analysis of Tryptophan Fluorescence Spectra and Their Correlation with Protein Structural Parameters / J. Hixon, Y.K. Reshetnyak // Algorithms. – 2009. – Vol. 2. – P. 1155 – 1176

151. Hummel, S.G. Nitric oxide as a cellular antioxidant: A little goes a long way / S.G. Hummel // Free Radical Biology and Medicine. – 2006. – Vol. 40. – P. 501 – 506

152. Ishii, Y. Distinct localization of lipid rafts and externalized phosphatidylserine at the surface of apoptotic cells / Y. Ishii, T. Mori, A. Shiratsuchi, Y. Nakai, Y. Shimada, Y. Ohno-Iwashita, Y. Nakanishi / Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2005. – Vol. 327. – P. 94 – 99

153. Jackson, M.J. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology / M.J. Jackson // Proceedings of the Nutrition Society – 1999. – Vol. 58. – P. 1001 – 1006

154. Jeevan, A. Ultraviolet radiation reduces phagocytosis and intracellular killing of mycobacteria and inhibits nitric oxide production by macrophages in mice / A. Jeevan, C.D. Bucana, Z. Dong, V.V. Dizon, S.L. Thomas, T.E. Lloyd, M.L. Kripke // Journal of Leukocyte Biology. – 1995. – Vol. 57. – P. 883 – 890

155. Jiang, Q. UV radiation down-regulates Dsg-2 via Rac/NADPH oxidase-mediated generation of ROS in human lens epithelial cells / Q. Jiang, C. Zhou, S. Healey, W. Chu, N. Kouttab, Z. Bi, Y. Wan / International Journal of Molecular Medicine. – 2006. – Vol. 18, № 2. – P. 381 – 388

156. Johansson, W.M. Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the aMb2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18) / W.M. Johansson, M. Patarroyo, F. Öberg, A. Siegbahn, K. Nilsson // Journal of Cell Science. – 1997. – Vol. 110. – P. 1133 – 1139

157. Jung, J.M. Effect of Dielectric Barrier Discharge Treatment of Blood Plasma to Improve Rheological Properties of Blood / J.M. Jung, Y. Yang, D.H. Lee, G. Fridman, A. Fridman, Y.I. Cho // Plasma Chemistry and Plasma Processing. – 2012. – Vol. 32. – P. 165 – 176

158. Kantar, A. Plasma Membrane Fluidity and Polarity of Polymorphonuclear Leukocytes from Children with Type I Diabetes Mellitus / A. Kantar, G.P. Littarru, G. Falcioni, V. Cherubini, V.C. Giovanni, R. Fiorini //Journal of Diabetes and Its Complications. – 1999. – Vol. 13. – P. 243 – 250

159. Kasahara, S. UVB irradiation suppresses cytokine production and innate cellular immune functions in mice / S. Kasahara, K. Aizawa, M. Okamiya, N. Kazuno, S. Mutoh, H. Fugo, E.L. Cooper, H. Wago // Cytokine. – 2001. – Vol. 14. – P. 104 – 111

160. Kastorna, A. Membrane effects of lysozyme amyloid fibrils / A. Kastorna, V. Trusova, G. Gorbenkoa, P. Kinnunen // Chemistry and Physics of Lipids. – 2012. – Vol. 165. – P. 331 – 337

161. Keidar, M. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy / M. Keidar, R. Walk, A. Shashurin, P. Srinivasan, A. Sandler, S. Dasgupta, R. Ravi, R. Guerrero-Preston, B. Trink // British Journal of Cancer. – 2011. – Vol. 105. – P. 1295 – 1301

162. Kelm, S. Sialic acids in molecular and cellular interactions / S. Kelm, R. Schauer // International Review of Cytology. – 1997. – Vol. 175. – P. 137 – 240

163. Kieft, I.E. Reattachment and apoptosis after plasma-needle treatment of cultures cells / I.E. Kieft, M. Kurdi, E. Stoffels // IEEE Transactions on Plasma Science. – 2006. – Vol. 34. – P. 1331 – 1336

164. Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe / S.J. Klebanoff // Journal of Leukocyte Biology. – 2005. – Vol. 77, № 5. – P. 598 – 625

165. Klebanov, G.I. Low Power Laser Irradiation Induces Leukocyte Priming / G.I. Klebanov, Yu. O. Teselkin, I.V. Babenkova, T.Yu. Bashkujeva, T.V. Chichuk, Yu.A. Vladimirov // General Physiology and Biophysics. – 1998. – Vol. 17, № 4. – P. 365 – 376

166. Köberlin, M.S. Functional crosstalk between membrane lipids and TLR biology / M.S. Köberlin, L.X. Heinz, G. Superti-Furga // Current Opinion in Cell Biology. – 2016. – Vol. 39. – P. 28 – 36

167. Kondo, T. Effect of reactive oxygen species generated with ultraviolet lamp and plasma on polyimide surface modification / T. Kondo, R. Watanabe, Y. Shimoyama, K. Shinohe, S. Kulinich, S. Iwamori // Surface and Interface Analysis – 2017. – Vol. 49, № 11. – P. 1 – 9

168. Kong, M.G. Plasma medicine: an introductory review / M.G. Kong, G. Kroesen, G. Morfill, T. Nosenko, T. Shimizu, J. Dijk, J.L. Zimmermann // New Journal of Physics. – 2009. – Vol. 11. – P. 1 – 37

169. Kosenko, E. Superoxide Production and Antioxidant Enzymes in Ammonia Intoxication in Rats / E. Kosenko, Y. Kaminsky, A. Kaminsky, M. Valencia, L. Lee, C. Hermenegildo, V. Felipo // Free Radical Research. –1997. – Vol. 27. – P. 637 – 644

170. Kubinova, S. Non-thermal air plasma promotes the healing of acute skin wounds in rats / S. Kubinova, K. Zaviskova, L. Uherkova, V. Zablotskii, O. Churpita, O. Lunov, A. Dejneka // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 1 – 11

171. Kudryashov Yu.B. The main principles of radiation biology // The Effects of Low Dose Radiation: New Aspects of Radiobiological Research Prompted by The Chernobyl Nuclear Disaster / edited by E.B. Burlakova, V.I. Naidich. – Boston: VSP, 2004. – P. 362 – 395

172. Kwon, Y-W. Characterizations of damages of DNA caused by plasma treatment and reactive species formed thereby / Y-W. Kwon, J. Jin // Polymers for Advanced Technologies. – 2015. – Vol. 26. – P. 762 – 770

173. Landis, G.N. Superoxide dismutase evolution and life span regulation / G.N. Landis, J. Tower // Mechanisms of Ageing and Development. – 2005. – Vol. 126, № 3. – P. 365 – 379

174. Laroussi, M. Perspective: The physics, diagnostics, and applications of atmospheric pressure low temperature plasma sources used in plasma medicine / M. Laroussi, X. Lu, M. Keidar // Journal of Applied Physics. – 2017. – Vol. 122. – P. 1 – 19

175. Leduc, M. Effects of Non-thermal Plasmas on DNA and Mammalian / M. Leduc, D. Guay, S. Coulombe, R.L. Leask // Plasma Processes and Polymers. – 2010. – Vol. 7. – P. 899 – 909

176. Lee, K. Macrophage Function Disorders / K. Lee, C. Yin, C. Verschoor, D. Bowdish // eLS. John Wiley & Sons. – 2013. – September. – P. 1 – 12

177. Lessey, B.A. Adhesion molecules and implantation / B.A. Lessey // Journal of Reproductive Immunology. – 2002. – Vol. 55, № 1 – 2. – P. 101 – 112

178. Lingwood, D. Lipid rafts as a membrane-organizing principle / D. Lingwood, K. Simons // Science. – 2010. – Vol. 327. – P. 46 – 50

179. Loura, M.S. Recent developments in molecular dynamics simulations of fluorescent membrane probes / M.S. Loura, J.P. Ramalho // Molecules. – 2011. – Vol. 16. – P. 5437 – 5452

180. Lu, X. Reactive species in non-equilibrium atmospheric-pressure plasmas: Generation, transport, and biological effects / X. Lu, G.V. Naidis, M. Laroussi, S.D.B. Reuter Graves, K. Ostrikov // Physics Reports. – 2016. – Vol. 630. – P. 1 – 84

181. MacMicking, J. Nitric oxide and macrophage function / J. MacMicking, Q.W. Xie, C. Nathan // Annual Review of Immunology. – 1997. – Vol. 15. – P. 323 – 350

182. Marelli-Berg, F.M. Molecular mechanisms of metabolic reprogramming in proliferating cells: implications for Tcell-mediated immunity / F.M. Marelli-Berg, H. Fu, C. Mauro // Immunology. – 2012. – Vol. 136, № 4. – P. 363 – 369

183. Martines, E. A novel plasma source for sterilization of living tissues / E. Martines, M. Zuin, R. Cavazzana, E. Gazza, G. Serianni, S. Spagnolo, M. Spolaore, A. Leonardi, V. Deligianni, P. Brun, M. Aragona, I. Castagliuolo // New Journal of Physics. – 2009. – Vol. 11. – P. 320 – 329

184. Martins, J. Molecular mechanism of lateral diffusion of py10-PC and free pyrene in fluid DMPC bilayers / J. Martins, E. Melo // Biophysical Journal. – 2001. – Vol. 80. – P. 832 – 840

185. Marwali, M.R. Membrane cholesterol regulates LFA-1 function and lipid raft heterogeneity / M.R. Marwali, J. Rey-Ladino, L. Dreolini // Blood. – 2003. – Vol. 102. – P. 215 – 222

186. May, R.C. Phagocytosis and actin cytoskeleton / R.C. May, L.M. Machesky // Journal of Cell Science. – 2001. – Vol. 114. – P. 1061 – 1077

187. McLoone, P. Adaptation to the UV-induced suppression of phagocytic activity in murine peritoneal macrophages following chronic exposure to solar simulated radiation / P. McLoone, M. Norval // Photochemical and Photobiological Sciences. – 2005. – Vol. 4. – P. 783 – 788

188. Michnik, A. Effect of UVC radiation on conformational restructuring of human serum albumin / A. Michnik, K. Michalik, Z. Drzazga // Journal of Photochemistry and Photobiology. – 2008. – Vol. 90. – P. 170 – 178

189. Miller, V. Plasma Stimulation of Migration of Macrophages / V. Miller, A. Lin, G. Fridman, D. Dobrynin, A. Fridman // Plasma Processes and Polymers. – 2014. – Vol. 11. – P. 1193 – 1197

190. Monti, E. Identification and expression of NEU3, a novel human sialidase associated to the plasma membrane / E. Monti, M.T. Bassi, N. Papini // Biochemistry. – 2000. – Vol. 349. – P. 343 – 351

191. Munch, G. Determination of advanced glycation end products in serum fluorescence spectroscopy and competitive ELISA / G. Munch, R. Keis, A. Wessels //

European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry. – 1997. – Vol. 35. – P. 669 – 677

192. Myers, K.R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics by Arf-family GTPases / K.R. Myers, J.E. Casanova // Trends in Cell Biology. – 2008. – Vol. 18. – P. 184 – 192

193. Nicol, M.J. Antibacterial effects of low-temperature plasma generated by atmospheric-pressure plasma jet are mediated by reactive oxygen species / M.J. Nicol, T. R. Brubaker, B.J. Honish, A.N. Simmons, A. Kazemi, M.A. Geissel, C.T. Whalen, C.A. Siedlecki, S.G. Bilén, S.D. Knecht, G.S. Kirimanjeswara // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – P. 1 – 11

194. Nicole, I. Use of UV radiation in water treatment: measurement of fotonic flux by hydrogen peroxide actinometry / I. Nicole, J. De Laat, M. Dore, J.P. Duguet, C. Bonnel // Water Research. – 1990. – Vol. 24. – P. 157 – 168

195. Nishikimi, N. The occurence of superoxide anion in the reduced phenazine methosulfate and zine molecular oxygen / N. Nishikimi, N.A. Rao, K. Iagi // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1972. – Vol.46, № 2. – P. 849 – 854

196. Norval, M. The Effect of Chronic Ultraviolet Radiation on the Human Immune System / M. Norval, P. McLoone, A. Lesiak, J. Narbutt // Photochemistry and Photobiology. – 2008. – Vol. 84. – P. 19 – 28

197. Nunes, P. Regulation of the NADPH Oxidase and Associated Ion Fluxes During Phagocytosis / P. Nunes, N. Demaurex, M.C. Dinauer // Traffic. – 2013. – Vol. 14. – P. 1118 – 1131

198. Ogura, R. Mechanism of lipid radical formation following exposure of epidermal homogenate to ultraviolet light / R. Ogura, M. Sugiyama, J. Nishi, N. Haramaki // Journal of Investigative Dermatology. – 1991. – Vol. 97. – P. 1044 – 1047

199. Oh, C. The time course of photoadaptation and pigmentation studied using a novel method to distinguish pigmentation from erythema / C. Oh, A. Hennessy, T.

Ha, Y. Bisset, B. Diffey, J.L. Rees // Journal of Investigative Dermatology. –2004. – Vol. 123. – P. 965 – 972

200. Olszewska, M. Oxidative stress modulates the organization of erythrocyte membrane cytoskeleton / M. Olszewska, J. Wiatrow, J. Bober, E. Stachowska, E. Gołembiewska, K. Jakubowska, M. Stańczyk-Dunaj, M. Pietrzak-Nowacka // Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej. – 2012. – Vol. 66. – P. 534 – 554

201. Pattison, D.I. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases / D.I. Pattison, M.J. Davies // Current Medicinal Chemistry. – 2006. – Vol. 13, № 27. – P. 3271 – 3290

202. Pavlou, S. Higher phagocytic activity of thioglycollateelicited peritoneal macrophages is related to metabolic status of the cells / S. Pavlou, L. Wang, H. Xu, M. Chen // Journal of Inflammation. – 2017. – Vol. 14, №4. – P. 1 – 6

203. Phan, A.T. Metabolic and epigenetic coordination of T-cell and macrophage immunity / A.T. Phan, A.W. Goldrath, C.K. Glass // Immunity. – 2017. – Vol. 46, № 5. – P. 714 – 729

204. Piasecka, J. Diffusion Mapping of Eosinophil-Activation State / J. Piasecka, C.A. Thornton, P. Rees, H.D. Summers // Cytometry Part A. – 2020. – Vol. 97, № 3. – P. 253 – 258

205. Piroddi, M. Oxidatively-modified and glycated proteins as candidate pro-inflammatory toxins in uremia and dialysis patients / M. Piroddi, I. Depunzio, V. Calabrese // Amino Acids. – 2007. – Vol. 32, № 4. – P. 573 – 592

206. Pixley, F.J. Macrophage migration and its regulation by CSF-1 / F.J. Pixley // International Journal of Cell Biology. – 2012. – ID 501962. – P. 1 – 12

207. Radhakrishnan, A. Condensed complexes, rafts, and the chemical activity of cholesterol in membranes / A. Radhakrishnan, T.G. Anderson, H.M. McConnell // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 12422 – 12427

208. Ranall, M.V. High-content imaging of neutral lipid droplets with 1,6-diphenylhexatriene / M.V. Ranall, B.G. Gabrielli, T.J. Gonda // BioTechniques. – 2011. – Vol. 51, № 1. – P. 35 – 42

209. Repakova, J. Influence of DPH on the structure and dynamics of a DPPC bilayer / J. Repakova, J.M. Holopainen, M.R. Morrow, M.C. McDonald, P. Capcova // Biophysical Journal. – 2005. – Vol. 88. – P. 3398 – 3410

210. Robert, E. Perspectives of endoscopic plasma applications / E. Robert, M. Vandamme, L. Brullé, S. Lerondel, A. le Pape, V. Sarron, D. Riès, T. Darny, S. Dozias, G. Collet // Clinical Plasma Medicine. – 2013. – Vol. 1. – P. 8 – 16

211. Roca-Cusachs, P. Rheology of passive and adhesion-activated neutrophils probed by atomic force microscopy / P. Roca-Cusachs, I. Almendros, R. Sunyer // Biophysical Journal. – 2006. – Vol. 91. – P. 3508 – 3518

212. Rosenspire, A.J. Interferon-γ and sinusoidal electric fields signal by modulating NAD(P)H oscillations in polarized neutrophils / A.J. Rosenspire, A.L. Kindzelskii, H.R. Petty // Biophysical Journal. – 2000. – Vol. 79. – P. 3001 – 3008

213. Sahin, E. Stress dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold) / E. Sahin, S. Gümüşlü // Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. – 2007. – Vol. 34, № 5 – 6. – P. 425 – 431

214. Samoilenko, S.G. Estimation of lipid microviscosity in biological membranes from excimerization of pyrene / S.G. Samoilenko, G.V. Kaler, S.V. Konev // Biofizika. – 1999. – Vol. 44. – P. 455 – 460

215. Sanchez-Madrid, F. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions / F. Sanchez-Madrid, M.A. delPoro // The EMBO Journal. – 1999. – Vol. 18. – P. 501 – 511

216. Sathiyapriya, V. Enhanced glycation of hemoglobin and plasma proteins is associated with increased lipid peroxide levels in non-diabetic hypertensive subjects / V. Sathiyapriya, N. Selvaraj, H. Nandeesha // Archives of Medical Research. – 2007. – Vol. 38, № 8. – P. 822 – 826

217. Schmidt, A. Non-thermal plasma treatment is associated with changes in transcriptome of human epithelial skin cells / A. Schmidt, K. Wende, S. Bekeschus, L. Bundscherer, A. Barton, K. Ottmüller, K.D. Weltmann, K. Masur // Free Radical Research. – 2013. – Vol. 47. – P. 577 – 592

218. Schmitt, D.A. Exposure to ultraviolet radiation causes dendritic cells/macrophages to secrete immune-suppressive IL-12p40 homodimers / D.A. Schmitt, S.E. Ullrich // The Journal of Immunology. – 2000. – Vol. 165. – P. 3162 – 3167

219. Sengenes, C. Increased lipolysis in adipose tissue and lipid mobilization to natriuretic peptides during low-calorie diet in obese women / C. Sengenes, V. Stich, M. Berlan // International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders. – 2002. – Vol. 26. – P. 24 – 32

220. Sethi, G. In vitro activation of murine peritoneal macrophages by ultraviolet B radiation: upregulation of CD18, production of NO, proinflammatory cytokines and a signal transduction pathway / G. Sethi, A. Sodhi / Molecular Immunology. – 2004. – Vol. 40. – P. 1315 – 1323

221. Seyrantepe, V. Regulation of Phagocytosis in Macrophages by Neuraminidase 1 / V. Seyrantepe, A. Iannello, F. Liang, E. Kanshin, P. Jayanth, S. Samarani, M. Szewczuk, A. Ahmad, A.V. Pshezhetsky // The journal of biological chemistry. – 2010. – Vol. 285, № 1. – P. 206 – 215

222. Shashurin, A. Living tissue under treatment of cold plasma atmospheric jet / A. Shashurin, M. Keidar, S. Bronnikov, R.A. Jurjus, M.A. Stepp // Applied Physics Letters. – 2008. – Vol. 93. – P. 1 – 3

223. Sheehan, J.M. Repeated ultraviolet exposure affords the same protection against DNA photodamage and erythema in human skin types II and IV but is associated with faster DNA repair in skin type IV / J.M. Sheehan, N. Cragg, C.A. Chadwick, C.S. Potten, A.R. Young // Journal of Investigative Dermatology. – 2002. – Vol. 118. – P. 825 – 829

224. Shenstone, F.S. Ultraviolet and visible spectroscopy of lipids // N.Y. – 1971. – P. 77 – 93

225. Sheppard, F.R. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation / F.R. Sheppard, M.R. Kelher, E.E. Moore // Journal of Leukocyte Biology – 2005. – Vol. 78. – P. 1025 – 1042

226. Skowronska, M. Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity / M. Skowronska, J. Albrecht // Neurochemistry International. – 2013. – Vol. 62, № 5. – P. 731 – 737

227. Smith, J.B. Malondialdehyde formation as an indication of prostaglandin production by human platelets / J.B. Smith, C.M. Ingerman, M.J. Silver // The Journal of laboratory and clinical medicine. – 1976. – Vol. 88. – P. 167 – 172

228. Souabni, H. The physicochemical properties of membranes correlate with the NADPH oxidase activity / H. Souabni, F. Wien, T. Bizouarn, C. Houee-Levin, M. Refregiers, L. Baciou // Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects. – 2017. – Vol. 1861, № 1, Part B. – P. 3520 – 3530

229. Squier, T.C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging / T.C. Squier // Experimental Gerontology. – 2001. – Vol. 36, № 9. – P. 1539 – 1550

230. Stoffels, E. Delayed effects of cold atmospheric plasma on vascular cells / E. Stoffels, A.J.M. Roks, L.E. Deelmm // Plasma Processes and Polymers. – 2008. – Vol. 5. – P. 599 – 605

231. Sumimoto, H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species / H. Sumimoto // The FEBS Journal. – 2008. – Vol. 275. – P. 3249 – 3277

232. Taylor, P.R. Macrophage receptors and immune recognition. / P.R. Taylor, L. Martinez-Pomares, M. Stacey // Annual Review of Immunology. – 2005. – Vol. 23. P. 901 – 944

233. Thannickal, V.J. Reactive oxygen species in cell signaling / V.J. Thannickal, B.L. Fanburg // AJP Lung Cellular and Molecular Physiology. – 2000. – Vol. 279. – P. 1005 – 1028

234. Varki, A. Multifarious roles of sialic acids in immunity / A. Varki, P. Gagneux // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2012. – Vol. 1253. – P. 16 – 36

235. Vivian, J.T. Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins / J.T. Vivian, P.R. Callis // Biophysical Journal. – 2001. – Vol. 80. – P. 2093 – 2109

236. Wang, D. Sialylation and desialylation dynamics of monocytes upon differentiation and polarization to macrophages / D. Wang, E. Ozhegov, L. Wang, A. Zhou, H. Nie, Y. Li, X. Sun // Glycoconjugate Journal. – 2016. – Vol. 33. – P. 725 – 733

237. Witko-Sarsat, V. Advanced oxidation protein products as novel markers of oxidative stress in ischemia / V. Witko-Sarsat, M. Friedlander // Journal of Neurochemistry. – 2000. – Vol. 22, № 6. – P. 342 – 350

238. Wu, B. Electrophysiology properties of voltage-gated potassium channels in rat peritoneal macrophages / B. Wu, X. Wang, B. Zhao, E. Bian, H. Yan, H. Cheng, X. Lv, Z. Xiong, J. Li // International Journal of Clinical and Experimental Medicine. – 2013. – Vol. 6, № 3. – P. 166 – 173

239. Yim, M.B. Enzyme-like activity of glycated cross-linked proteins in free radical generation. / M.B. Yim, S.O. Kang, P.B. Chock // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2000. – Vol. 899. – P. 168 – 181

240. Young, S.R. Effect of light on calcium uptake by macrophages / S.R. Young, M. Dyson, P. Bolton // Laser Therapy. – 1990. – Vol. 5. – P. 53 – 57

241. Yousfi, M. Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: Toward new pharmaceutical treatments in medicine / M. Yousfi, N. Merbahi, A. Pathak, O. Eichwald // Fundamental and Clinical Pharmacology. – 2014. – Vol. 28. – P. 123 – 135

242. Yu, W. Improvement of host response to sepsis by photobiomodulation / W. Yu, L.H. Chi, J.O. Naim, R.J. Lanzafame // Lasers in Surgery and Medicine. – 1997. – Vol. 21. – P. 262 – 268

243. Zelko, I.N. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu, Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures,

evolution, and expression / I.N. Zelko, T.J. Mariani, R.J. Folz // Free Radical Biology and Medicine. – 2002. – Vol. 33, № 3. – P. 337 – 349

244. Zhang, X. The isolation and characterization of murine macrophages / X. Zhang, R. Goncalves, D.M. Mosser // Current protocols in immunology. – 2008. – Unit 14.

245. Zhevago, N.A. The regulatory effect of polychromatic (visible and infrared) light on human humoral immunity / N.A. Zhevago, K.A. Samoilova, K.D. Obolenskaya // Photochemical and Photobiological sciences. – 2004. – Vol. 3, № 1. – P. 102 – 108