

Assessment of the Action of Cold Helium Plasma on Metabolic and Physico-chemical Parameters of Rats Blood

Andrew K. Martusevich^{1,*}, Anna G. Soloveva²,

Svetlana Yu. Krasnova¹, Alexander G. Galka¹ and Elena S. Golygina¹

¹ Laboratory of medical biophysics, Privolzhsky Research Medical University; 603155, Russia, Nizhny Novgorod, Minin sq., 10/1

² Laboratory of experimental medicine, Privolzhsky Research Medical University; 603155, Russia, Nizhny Novgorod, Minin sq., 10/1

*E-Mail: cryst-mart@yandex.ru

Received February 21, 2019

The aim of this paper was to study the effect of cold helium plasma on the parameters of oxidative metabolism and crystallogenic activity of rat blood plasma.

Material and methods: The experiment was performed on 20 male Wistar rats divided into control (n=10, without manipulation) and main (n=10) groups. Animals of the main group underwent a course, which included 10 daily procedures for processing a pre-epilated area of the back skin (area – 10% of the body surface) with a stream of helium cold plasma (duration – 1 min.). Upon completion of the course, the intensity of lipid peroxidation, total antioxidant activity, malon dialdehyde level and superoxide dismutase activity were determined in the blood of all rats, and crystallogenic properties were evaluated. The conjugation of potential shifts was carried out by correlation analysis.

Results: It was found that cold helium plasma transforms oxidative metabolism of blood plasma and its crystallogenic properties, acting as an agent with moderate antioxidant properties and a stimulant of dehydration structuring. In this case, the antioxidant effect is realized, among other things, due to the activation of superoxide dismutase.

Key words: helium cold plasma, stress, blood plasma, oxidative metabolism, crystallization

В настоящее время отмечается возрастание интереса как отечественных, так и зарубежных исследователей к применению холодной плазмы в медицине (Алейник, 2011; Alshraideh *et al.*, 2016; Kong *et al.*, 2009; Laroussi, 2009; Scholtz *et al.*, 2015). В первую очередь этот интерес основан на продемонстрированной экспериментально и клинически антибактериальной активности холодной плазмы (Alshraideh *et al.*, 2016; Butscher *et al.*, 2016; Duske *et al.*, 2015; Ermolaeva *et al.*, 2011; Flynn *et al.*, 2016). С другой стороны, многие аспекты плазменной медицины остаются нераскрытыми. Так, слабо изучены общие механизмы действия холодной плазмы на биологические объекты, неизвестны и молекулярные мишени противомикробного и других эффектов (Flynn *et al.*, 2016; Dobrynin *et al.*, 2009; Stoffels *et al.*, 2008; Wiegand *et al.*, 2016). Представленные в литературе сведения о целесообразности применения холодной плазмы носят преимущественно эмпирический и феноменологический характер, не раскрывая механизмов ее влияния на организм человека и животных, а также бактериальные клетки.

В наших предшествующих работах было показано, что в условиях *in vitro* гелиевая холодная плазма модифицирует свободнорадикальные процессы и кристаллогенные свойства плазмы крови человека (Мартусевич *с соавт.*, 2018; Мартусевич *с соавт.*, 2017). Установлено, что изучаемый агент для образцов биосреды служит антиоксидантным фактором, а также умеренно стимулирует ее дегидратационную структуризацию. Следовательно, представляется необходимым оценить влияние холодной плазмы на указанные параметры крови *in vivo*. В связи с этим, целью исследования явилось изучение действия холодной гелиевой плазмы на параметры окислительного метаболизма и кристаллогенную активность плазмы крови крыс.

MATERIALS AND METHODS

Эксперимент выполнен на 20 половозрелых крысах-самцах линии Вистар (масса тела – 200-250 г.), разделенных на 2 группы. Первая (контрольная) группа животных (n=10) была интактной, с ними не

проводили никаких манипуляций, кроме однократного получения образцов крови. Животным второй (основной) группы (n=10) проводили курс, включавший 10 ежедневных процедур обработки предварительно эпилированного участка кожи спины (площадь – 10% поверхности тела) потоком гелиевой холодной плазмы. Продолжительность каждой процедуры составляла 1 мин. Расстояние от края «плазменного факела» равнялось 1,0-1,5 см. Конструктивные характеристики генератора предполагали регулирование параметров образуемой холодной плазмы с учетом особенностей обрабатываемой поверхности.

Получение холодной плазмы производили с помощью специальной установки, использующей принцип СВЧ-индуцированной ионизации газового потока и разработанной в Институте прикладной физики РАН (г. Нижний Новгород). Прибор генерирует низкотемпературную холодную плазму атмосферного давления в среде инертного газа (гелий, аргон, неон, криптон) с температурой 30-45 градусов Цельсия. Конструктивно прибор выполнен в виде моноблока управления и подключенного к нему посредством гибкого шланга аппликатора, в котором генерируется холодная плазма. Встроенная в моноблок плата управления (контроллер управления) позволяет контролировать и регулировать параметры холодной плазмы. Энергия, необходимая для создания плазмы, поступает от блока управления к аппликатору в виде импульсов с амплитудой 10кВ и длительностью 2,5мкс с регулируемой скважностью. Для передачи энергии используется радиочастотный кабель РК 50-2-22, проходящий внутри шланга для подачи рабочего газа. Длительность импульса 2.5мкс, скважность 10. Мощность, вкладываемая в создание плазмы, влияет на степень ионизации газа. В приборе предусмотрена плавная регулировка мощности от 10 до 100% от максимального уровня. Потребляемая мощность не превышает 50 Вт, источник – однофазная сеть 220В/50Гц. Рабочий газ из баллона через газовый редуктор под давлением от 1.5 до 4атм подается на рабочий аппликатор через блок управления со встроенным датчиком расхода газа

для контроля и регулирования потоком плазмы в соответствии с заданным уровнем, регулируемым в пределах 0,2-4л/мин.

В качестве газа-носителя плазмы использовали баллонный гелий марки А.

В плазме крови крыс обеих групп методом Фен-индуцированной биохемилюминесценции определяли максимальную фотовспышку хемилюминесценции (I_{max}), рассматриваемую в качестве критерия интенсивности перекисного окисления липидов, и параметр, обратный светосумме хемилюминесценции ($1/S$) и зависящий от количества свободных радикалов в анализируемой среде и общей антиоксидантной активности плазмы крови. Измерения проводили на аппарате БХЛ-06 (фирма «Медозонс», Нижний Новгород). Уровень малонового диальдегида (МДА) в плазме крови оценивали по методу Сидоркина, и Чулошниковой (1993). Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали по Т.В. Сироте (1999).

Для проведения кристаллоскопического исследования плазму крови в объеме 100 мкл. наносили на предметное стекло и приготавливали микропрепараты высушенной биологической жидкости в соответствии с методом кристаллоскопии, позволяющим оценивать собственную кристаллогенную активность биосреды (Мартусевич с соавт., 2018; Мартусевич, Камакин, 2007). Высушенные микропрепараты оценивали морфологически (путем описания особенностей структуризации высушенного образца биологической жидкости) и визуаметрически (с применением собственной системы параметров) (Мартусевич, Камакин, 2007). Основными визуаметрическими показателями, оцениваемыми в балльной шкале, служили кристаллизуемость (отражает количественную сторону кристаллизации – плотность кристаллических элементов в фации), индекс структурности (характеризует сложность структуропостроения), степень деструкции фации (представляет собой индикатор качественной стороны процесса – правильности образования структур) и выраженность краевой зоны микропрепарата.

Полученные в ходе исследования данные обработаны с помощью пакета статистических программ Statistica 6.1 for Windows. Проверка на нормальность распределения проведена с помощью критерия Шапиро – Уилка. С учетом характера распределения признака для оценки статистической значимости различий применяли Н-критерий Краскала-Уоллеса. Данные представляли в формате $M \pm m$. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Установлено, что курс ежедневной обработки участка кожи спины крыс гелиевой холодной плазмой способствует модификации состояния плазмы крови животных. Так, существенные сдвиги были зарегистрированы в отношении параметров окислительного метаболизма биологической жидкости. В частности, изучаемое воздействие обеспечивает умеренную стимуляцию процессов липопероксидации, о чем свидетельствует увеличение максимальной фотовспышки биохемилюминесценции на 36,5% ($p < 0,05$; рис. 1А). В то же время уровень общей антиоксидантной активности плазмы возрастает более выражено (на 41,6%; $p < 0,05$; рис. 1Б). В совокупности подобные изменения свидетельствуют об антиоксидантном действии холодной гелиевой плазмы.

Эта тенденция полностью подтверждается и на основании оценки других параметров, характеризующих состояние окислительного метаболизма (рис. 2). Так, у животных основной группы отмечали снижение концентрации в плазме вторичного продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (на 31,7%; $p < 0,05$). Это косвенно указывает на снижение темпов данного процесса. Кроме того, по завершении курса воздействия холодной плазмой регистрировали умеренную активацию одного из основных антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, каталитическая активность которой возрастала на 42,0% по сравнению с интактными крысами ($p < 0,05$). Подобная динамика позволяет заключить, что изучаемый фактор может рассматриваться в качестве стимулятора

антиоксидантной системы плазмы крови.

Вторым компонентом оценки биологических эффектов гелиевой холодной плазмы явилось изучение ее влияния на кристаллогенную активности плазмы крови крыс. Выявлено, что рассматриваемое воздействие обеспечивает усиление кристаллогенной активности биологической жидкости (рис. 3). Это реализуется в параллельном повышении кристаллизуемости (в 2,07 раза относительно интактных животных; $p < 0,05$) и индекса структурности (на 48,4%; $p < 0,05$), отражающих плотность кристаллических элементов и сложность их структуропостроения соответственно.

В то же время изучаемое воздействие способствует повышению степени деструкции фации в микропрепаратах высушенной плазмы крови в 2,1 раза ($p < 0,05$; рис. 4), однако, с учетом того, что значение параметра у всех крыс основной группы не

превышает 1,5 балла, указанные сдвиги остаются в пределах адапционных (Мартусевич, Камакин, 2007; Громова, 2005; Кидалов с соавт., 2004). В совокупности с умеренным (на 38,3% по сравнению с уровнем, характерным для интактных животных; $p < 0,05$) сужением краевой белковой зоны фаций биосреды это потенциально указывает на трансформацию органо-минерального состава биожидкости и количественного соотношения ее отдельных компонентов.

Также нами был изучен характер сопряжения между сдвигами биохимических и кристаллоскопических параметров, формирующийся под влиянием обработки животных холодной плазмой. Методом корреляционного анализа установлено, что между рассматриваемыми группами показателей существуют многочисленные взаимосвязи, структура которых представлена на рисунке 5.

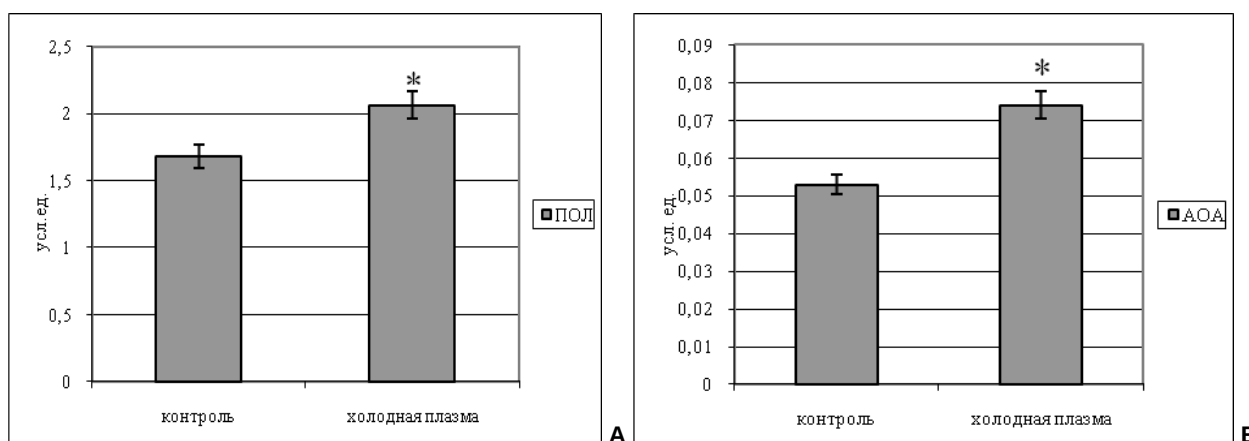


Figure 1. Параметры индуцированной биохемилюминесценции плазмы крови у интактных и обработанных потоком холодной плазмы крыс: А. Интенсивность перекисного окисления липидов, Б. Антиоксидантная активность («*» - уровень статистической значимости межгрупповых различий $p < 0,05$).

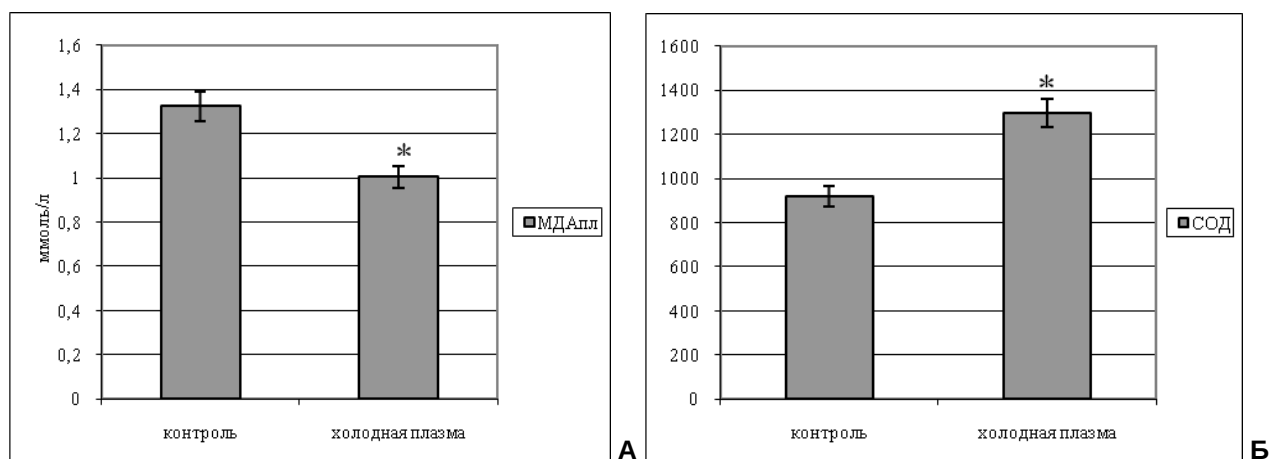


Figure 2. Параметры окислительного метаболизма плазмы крови у интактных и обработанных потоком холодной плазмы крыс: А. Уровень малонового диальдегида; Б. Активность супероксиддисмутазы («*» - уровень статистической значимости межгрупповых различий $p < 0,05$)

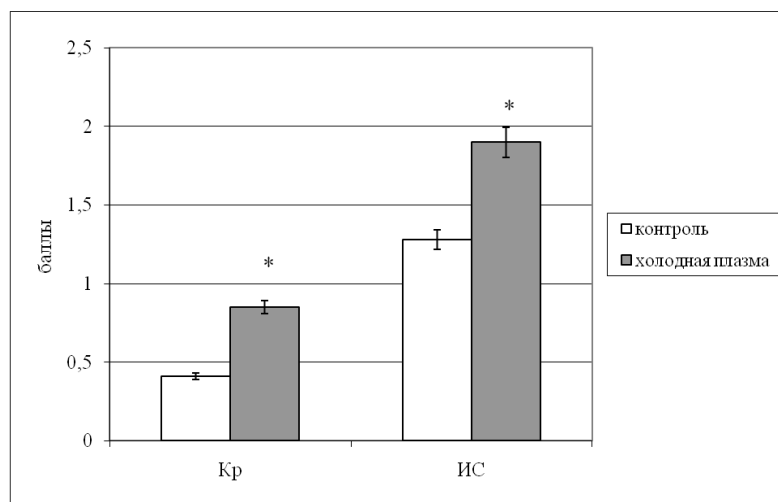


Figure 3. Кристаллизуемость (Кр) и индекс структурности (ИС) плазмы крови у интактных и обработанных потоком холодной плазмы крыс («*» - уровень статистической значимости межгрупповых различий $p < 0,05$)

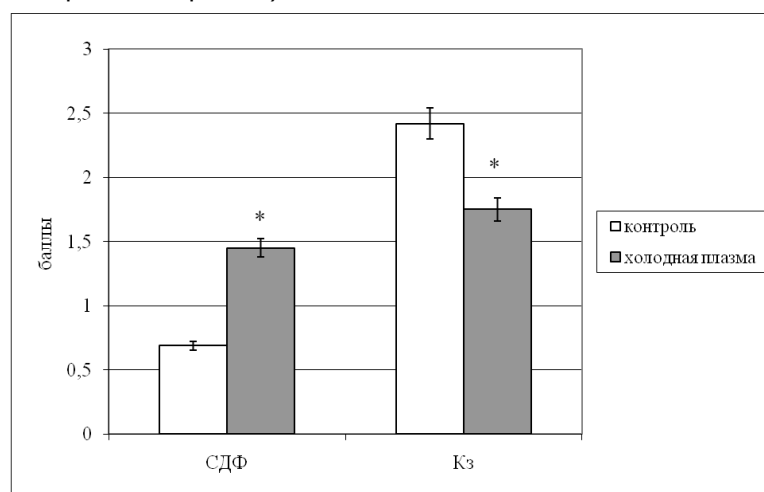


Figure 4. Степень деструкции фации (СДФ) и выраженность краевой белковой зоны (Кз) в фациях плазмы крови интактных и обработанных потоком холодной плазмы крыс («*» - уровень статистической значимости межгрупповых различий $p < 0,05$)

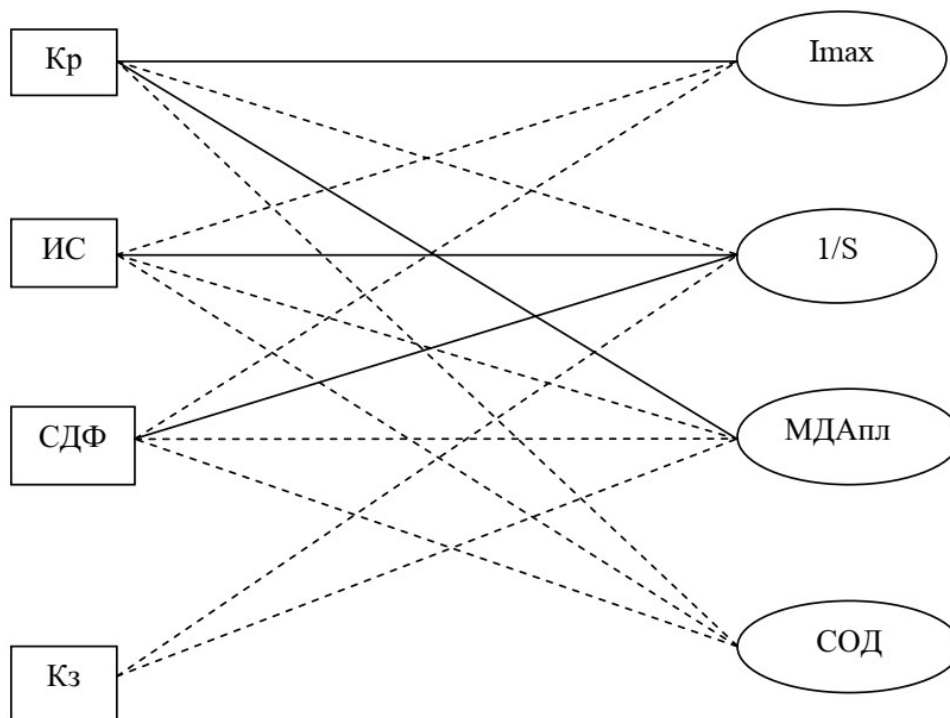


Figure 5. Результаты корреляционного анализа сдвигов биохимических и кристаллоскопических показателей у обработанных потоком холодной плазмы крыс (сплошными линиями обозначены сильные связи, пунктирными – связи средней силы; Кр – кристаллизуемость, ИС – индекс структурности, СДФ – степень деструкции фации, Кз – выраженность краевой зоны, Imax – максимальная интенсивность фотовспышки хемилюминесценции, 1/S – параметр, обратный светосумме хемилюминесценции)

В частности, уровень кристаллизуемости, отражающий плотность кристаллических элементов в фации, демонстрирует сильную корреляцию с максимальной фотовспышкой хемилюминесценции ($r=+0,880$; $p<0,05$) и плазменной концентрацией малонового диальдегида ($r=-0,725$; $p<0,05$). Это может быть обусловлено возрастанием количества потенциально кристаллообразующих элементов в условиях интенсификации свободнорадикальных процессов, а также способностью альдегидов выступать в качестве ингибиторов кристаллизации. Кроме того, представляет интерес выделить наличие прямой, приближающейся к сильной корреляции между степенью деструкции фации и максимальной фотовспышкой ($r=+0,665$; $p<0,05$) и сильной обратной – с величиной, противоположной светосумме хемилюминесценции ($r=-0,771$; $p<0,05$). Учитывая биологический смысл степени деструкции как интегрального индикатора выраженности патологических сдвигов в биожидкости, выявленная динамика свидетельствует о повышении уровня

параметра при активации липопероксидации и снижении антиоксидантных резервов плазмы крови, что является критериями развития окислительного стресса.

CONCLUSION

Таким образом, холодная гелиевая плазма направленно трансформирует окислительный метаболизм плазмы крови и ее кристаллогенные свойства, выступая в качестве агента с умеренными антиоксидантными свойствами и стимулятора дегидратационной структуризации. При этом антиоксидантный эффект реализуется в том числе за счет активации супероксиддисмутазы.

REFERENCES

- Алейник А.Н. (2011) Плазменная медицина. Томск: Изд-во ТПУ. 45 с.
Громова И.П. (2005) Кристаллоскопический способ изучения сыворотки крови в токсиколого-

- гигиеническом эксперименте методом «открытая капля». *Гигиена и санитария*, **2**, 66-69.
- Кидалов В.Н., Хадарцев А.А., Якушина Г.Н. (2004) Тезиснографические исследования крови и их практические возможности. *Вестник новых медицинских технологий*, **11 (1-2)**, 23-25.
- Мартусевич А.К., Камакин Н.Ф. (2007) Унифицированный алгоритм исследования свободного и иницированного кристаллогенеза биологических жидкостей. *Клиническая лабораторная диагностика*, **6**, 21-24.
- Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Краснова С.Ю. с соавт. (2018) Влияние гелиевой холодной плазмы на метаболические и физико-химические параметры крови человека *in vitro*. *Биомедицина*, **2**, 47-58.
- Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Янин Д.В. с соавт. (2017) Влияние гелиевой холодной плазмы на параметры окислительного метаболизма крови *in vitro*. *Вестник новых медицинских технологий*, **24 (3)**, 163-166.
- Alshraiedeh N.H., Higginbotham S., Flynn P.B. et al. (2016) Eradication and phenotypic tolerance of *Burkholderia cenocepacia* biofilms exposed to atmospheric pressure non-thermal plasma. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **47**, 446-450.
- Butscher D., Zimmermann D. et al. (2016) Plasma inactivation of bacterial endospores on wheat grains and polymeric model substrates in a dielectric barrier discharge. *Food Control*. **60**, 636–645.
- Dobrynin D., Fridman D., Friedman G., Fridman A. Plasma interaction with living tissue. (2009) *New J. Phys.*, **11**, 1-26.
- Duske K., Wegner K., Donnert M. et al. (2015) Comparative *in vitro* study of different atmospheric pressure plasma jets concerning their antimicrobial potential and cellular reaction. *Plasma Process Polym.*, **12**, 1050-1060.
- Ermolaeva S.A., Varfolomeev A.F., Chernukha M.Yu et al. (2011) Bactericidal effects of non-thermal argon plasma *in vitro*, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J. Med. Microbiol.*, **60**, 75-83.
- Flynn P.B., Buseti A., Wielogorska E. et al. (2016) Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. *Sci. Rep.* **6**, 26320.
- Kong M.G., Kroesen G., Morfill G. et al. (2009) Plasma medicine: an introductory review. *New J. Phys.*, **11**, 115012.
- Laroussi M. (2009) Low-temperature plasmas for medicine? *IEEE Trans. Plasma Sci.* **37**, 714-725.
- Scholtz V. et al. (2015) Nonthermal plasma - A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol. Adv.*, **33 (6)**, 1108-1119.
- Stoffels E., Sakiyama Y., Graves D.B. (2008) Cold atmospheric plasma: charged species and their interactions with cells and tissues. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **36**, 1441-1457.
- Wiegand C., Fink S., Beier O. et al. (2016) Dose- and Time-Dependent Cellular Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma Evaluated in 3D Skin Models. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **29**, 257-265.