

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК: 57.03+579.6+57.033+57.036+57.042

Влияние низкотемпературной плазмы атмосферного давления на культуру клеток *Paramecium caudatum***Г.А. Груздев^{1,*} , О.В. Карпухина^{2,3}, В.Г. Якунин⁴, А.Н. Иноземцев², В.П. Савинов⁴, В.Ю. Тимошенко^{5,6,7}, А.А. Каменский¹**

¹Кафедра физиологии человека и животных и ²кафедра высшей нервной деятельности, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

³Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4, корп. 1;

⁴Кафедра физики полупроводников и криоэлектроники и ⁵кафедра физики низких температур и сверхпроводимости, физический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2;

⁶Физический институт имени П.Н. Лебедева, Российская академия наук, Россия, 119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 53;

⁷Национальный исследовательский ядерный университет, Московский инженерно-физический институт, Россия, 115409, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

*e-mail: gleb-neuro.phys@mail.ru

Исследовано воздействие низкотемпературной плазмы, генерируемой плазмотроном в инертном газе (аргон, гелий) и в смеси инертного газа и воздуха, на культуру клеток *Paramecium caudatum*. Обнаружено влияние состава плазмы на уровень кислотности водной среды и характер гибели клеток. Полученные результаты обсуждаются с учетом образуемых под действием плазменной струи активных радикалов, а также отложенной реакции клеток на плазменное воздействие.

Ключевые слова: инфузории, *Paramecium caudatum*, свободные радикалы, низкотемпературная плазма, плазмотрон, цитотоксический эффект

Известно, что воздействие низкотемпературной плазмы, получаемой при помощи относительно компактных источников высокочастотного или дугового разрядов — плазмотронов [1, 2], способно активировать окислительный стресс у клеток и одноклеточных организмов, который приводит к их гибели [3–5]. Такой способ воздействия можно использовать для селективного уничтожения больных или поврежденных клеток, которые более чувствительны к окислительному стрессу или термическому воздействию, поскольку имеют нарушения в механизмах адаптации [6–7].

Поскольку низкотемпературная плазма может быть образована различными газами [2], это приводит к большому разнообразию ее свойств [3], что, очевидно, может изменить характер воздействия на биосистемы. Для использования низкотемпературной плазмы в биомедицинских целях важно знать влияние ее состава на вызываемые эффекты в модельных биосистемах.

Удобным модельным объектом в изучении окислительного стресса является одноклеточный эукариотический организм *Paramecium caudatum*. Данный объект позволяет исследовать влияние вызванного плазменным воздействием окисли-

тельного стресса на различных уровнях биологической организации. При культивировании клеток *P. caudatum* за короткое время можно получить большое количество одинаковых клонов, которые будут находиться в равных условиях, что, несомненно, является преимуществом при статистической обработке [6, 7]. Целью настоящей работы стало исследование воздействия низкотемпературной плазмы, генерируемой плазмотроном в инертном газе (аргон, гелий) и в смеси инертного газа и воздуха, на культуру клеток *P. caudatum*.

Материалы и методы

Работа была выполнена на чистой колонии клеток *P. caudatum*, которые содержали в условиях приближенных к естественной среде обитания при температуре 24 °С при pH = 7 с соблюдением 12-часового светового дня и ежедневным кормлением. Для профилактики чистоты колонии и контроля численности особей (защита от перенаселения и последующего самоуничтожения) проводилась ежемесячная фильтрация колонии через мелкодисперсную губку. За сутки до эксперимента и до конца регистрации численности кормление инфузорий приостанавливалось.

Плазмотрон представлял собой высоко-рекурсивный источник дугового разряда, который давал возможность создавать поток низкотемпературной плазмы как в чистом инертном газе (аргон, гелий), так и в их смеси с воздухом [2, 3]. Мы использовали аргон (чистота 99,9996) и гелий (чистота 99,9996). Поток воздуха получался при помощи безмасляного компрессора Metabo Power 180-5W (Metabo, Германия). Плазменная дуга формировалась в потоке газа с расходом 2 л/мин, к которому на выходе в перпендикулярном направлении подводился дополнительный поток с расходом газа 10 л/мин (см. детали в ранее опубликованной работе [2]). В нашем случае низкотемпературной плазмы в газовой смеси поток воздуха использовался также для охлаждения элементов плазмотрона.

Схема эксперимента. При проведении эксперимента клетки *P. caudatum* из маточной культуры были разделены на три группы объемом по 6 мл с плотностью около 600 клеток/мл, которые помещались в стеклянные сосуды для последующей обработки низкотемпературной плазмой. Высота слоя жидкости в сосудах с клетками составляла 5 мм. Сосуды с клетками располагались на расстоянии 20 см от выходного отверстия плазмотрона, что позволяло избежать перегрева исследуемых образцов. Прямые измерения показали, что рост температуры водной среды не превышал 2–3 °C в течение 5 мин плазменного воздействия.

На первую группу клеток воздействовали низкотемпературной плазмой в течение 1 мин, на вторую группу – в течение 3 мин и на 3 группу – в течение 5 мин. Также на протяжении всего эксперимента измеряли pH среды. Подсчет клеток производился за сутки до воздействия, через 4, 24, 48 и 72 ч после воздействия плазмы. Подсчет клеток для каждой группы проводился по видеозаписям их траекторий движения, которые обрабатывались в программе ImageJ (Fiji, США) с использованием плагина “counting cell” [8].

Статистическая обработка. Статистический анализ проводился в программе Statistica 10 (StatSoft, США) с помощью непараметрического

критерия Манна–Уитни после проверки на нормальность критерием Шапиро–Вилко для больших выборок с $p < 0,05$. При графическом представлении полученных данных использовались значения интерквантильных размахов.

Результаты и их обсуждение

При изучении влияния воздействия низкотемпературной плазмы на уровень кислотности воды было установлено, что величина pH смещается к меньшим значениям (рис. 1А). При этом степень изменения зависела от состава плазмы и от времени воздействия. Так, в случае плазмы инертных газов наблюдается слабое снижение pH, которое более заметно для аргоновой плазмы. Данный эффект можно объяснить более эффективным возбуждением радикалов и метастабильных состояний молекул воздуха при взаимодействии с атомами аргона в метастабильных состояниях [5]. При использовании плазмы, в состав которой входил воздух, наблюдалось более резкое снижение уровня pH воды. Это можно объяснить более высокой концентрацией образующихся радикалов и возбужденных состояний кислорода, азота и оксидов азота, что вызывает формирование молекул пероксида в воде [9, 10].

Однако при воздействии низкотемпературной плазмы на водную суспензию маточной культуры *P. caudatum* изменения кислотности после воздействия не имели значимых отличий от значений кислотности необлученного маточного раствора с клетками (рис. 1Б). Это можно объяснить тем, что в процессе жизнедеятельности инфузории способны формировать буферную равновесную систему, которая предохраняет их от внешних воздействий [11]. При этом клетки могут поглощать активные формы кислорода, что, очевидно, приводит к их окислительному стрессу.

Далее в работе было рассмотрено воздействие низкотемпературной плазмы состава аргон-воздух и гелий-гелий на число клеток *P. caudatum* через 4, 24, 48 и 72 ч после плазменной обработки. На рис. 2 представлены зависимости относительного числа клеток от времени наблюдения после обра-

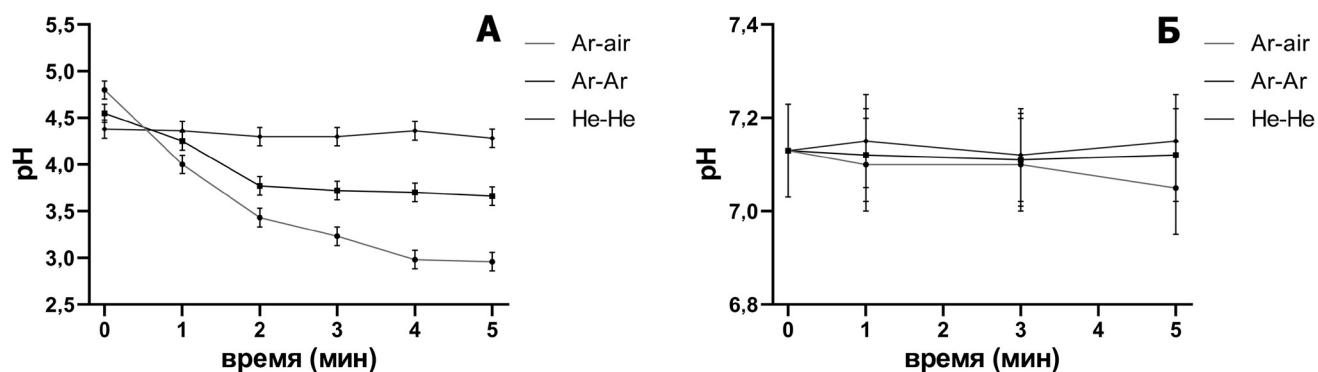


Рис. 1. Зависимости уровня pH от времени воздействия плазмы различного состава для (А) деионизованной воды, (Б) маточной культуры *Paramecium caudatum*.

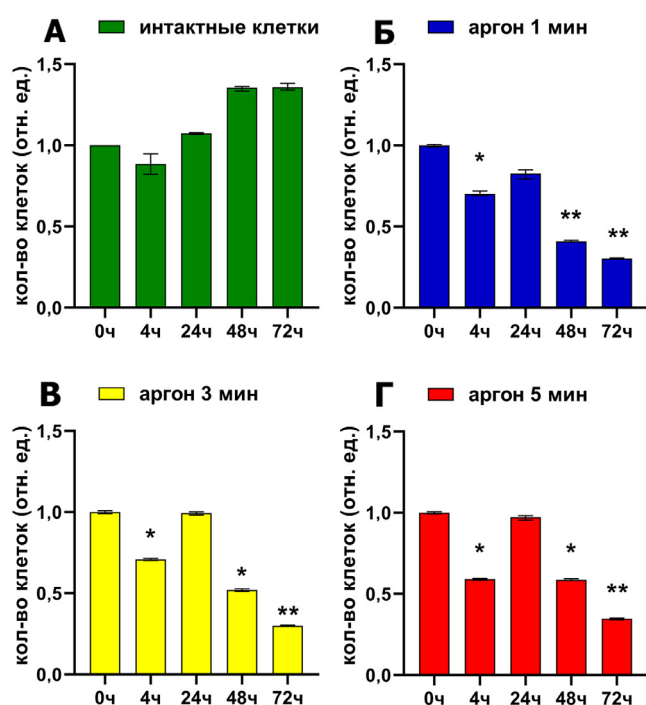


Рис. 2. Зависимость гибели клеток *Paramecium caudatum* в течение последующих 74 ч после обработки низкотемпературной аргоновой плазмой для следующих групп: А – контроль; Б – воздействие плазмой в течение 1 мин; В – воздействие плазмой в течение 3 мин; Г – воздействие плазмой в течение 5 мин. Звездочками (*) обозначены статистически значимые изменения по сравнению с исходным количеством клеток для каждой из групп, $p < 0,05$.

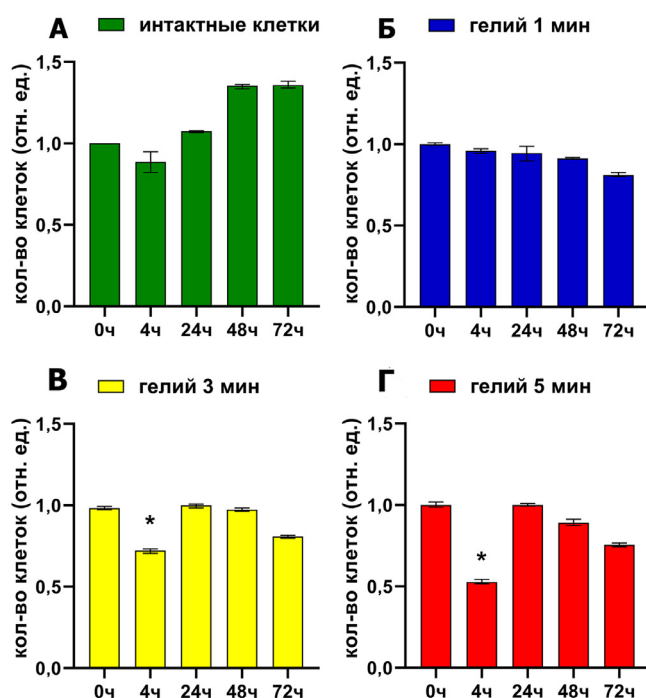


Рис. 3. Зависимость гибели клеток *Paramecium caudatum* в течение последующих 74 ч после обработки низкотемпературной гелиевой плазмой для следующих групп: А – контроль; Б – воздействие плазмой в течение 1 мин; В – воздействие плазмой в течение 3 мин; Г – воздействие плазмой в течение 5 мин. Звездочками (*) обозначены статистически значимые изменения по сравнению с исходным количеством клеток для каждой из групп, $p < 0,05$.

ботки аргоновой плазмой в течение 1, 3, 5 мин и в контрольной группе. Видно, что гибель клеток наступает спустя несколько часов после воздействия и доля погибших клеток возрастает в течение 72 ч наблюдения. При этом время плазменной обработки не является определяющим фактором для формирования окислительного стресса у клеток. В нашем исследовании показано, что даже кратковременное воздействие низкотемпературной плазмы приводит к гибели исследуемых организмов. В то же время, в отличие от первого опыта, гибель клеток наблюдается только в первые часы после воздействия. Это связано с тем, что образованные радикалы достаточно летучие и не накапливаются в среде и в клетках или повреждения носят поверхностный характер и не являются значительными для процесса деления клеток [12, 13].

Парамеция является живым одноклеточным организмом, поэтому способность к делению напрямую зависит от количества питательных веществ в среде. Это проявляется на 24-й ч после воздействия во всех трех сериях эксперимента. После гибели большого числа особей в среде появляется большое число органических остатков, которые поглощаются выжившими особями, что приводит к быстрому делению. Однако клетки образованные после деления также накапливают в себе активные формы кислорода и подвергаются сильному воздействию, что приводит к необратимым последствиям и нарушениям процессов деления.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о сложном и многофакторном влиянии состава низкотемпературной плазмы на жизнеспособность клеток *P. caudatum*. В то время как воздействие плазменной струи из смеси аргона и воздуха на чистую воду приводит к существенному уменьшению уровня pH, для культуры клеток *P. caudatum* уровень кислотности среды после плазменной обработки практически не изменялся. При этом наиболее стабильное подавление размножения клеток фиксировалось после плазменной обработки в потоке чистого гелия, воздействие которого не вызвало заметного изменения уровня кислотности среды. Данный эффект можно связать с прямым переносом энергии от возбужденных атомов гелия на реализацию биохимических окислительных процессов в клетках. Полученные результаты указывают на возможность использования низкотемпературной плазмы для очистки воды от биозагрязнений, а также для обработки медицинских приборов и рабочих поверхностей.

Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (тема № 121032500080-8). Исследования проведены без использования лабораторных животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Savinov V.P., Yakunin V.G., Karpukhina O.V., Inozemtsev A.N., Timoshenko V.Y., Riaby V.A. Influence of low-temperature atmospheric pressure plasma on the vital functions of microorganisms // J. Phys. Conf. Ser. 2019. Vol. 1348. N 1: 012007.
2. Kim J., Katsurai M., Kim D., Ohsaki H. Microwave-excited atmospheric-pressure plasma jets using a microstrip line // Appl. Phys. Lett. 2008. Vol. 93. N 19: 191505.
3. Jobiliong E., Suyanto H., Marpaung A.M., Abdulmadjid S.N., Idris N., Hedwig R., Ramli M., Pardede M., Suliyanti M.M., Kagawa K., Fukumoto K.-I., Tjia M.O., Lie T.J., Lie Z.S., Kurniawan K.H. Spectral and dynamical characteristics of the plasma emission and its effect on laser-ablated target emission in double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) experiment // Appl. Spectrosc. 2015. Vol. 69. N 1. P. 115–123.
4. Inozemtsev A.N., Karpukhina O.V., Melikhov I.V., Riaby V.A., Savinov V.P., Timoshenko V.Y., Yakunin V.G. Effect of low temperature plasma of atmospheric pressure on single-cell model organisms of ciliate *Paramecium caudatum* // J. Phys. Conf. Ser. 2019. Vol. 1238. N 1: 012050.
5. Canesi L. Pro-oxidant and antioxidant processes in aquatic invertebrates // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2015. Vol. 1340. N 1. P. 1–7.
6. Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Karpukhina O.V., Bokieva S.B., Inozemtsev A.N. Biosynthesis of isocitric acid in repeated-batch culture and testing of its stress-protective activity // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. Vol. 103 N 8. P. 3549–3558.
7. Morgunov I.G., Karpukhina O.V., Kamzolova S.V., Samoilenko V.A., Inozemtsev A.N. Investigation of the effect of biologically active threo-Ds-isocitric acid on oxidative stress in *Paramecium caudatum* // Prep. Biochem. Biotechnol. 2018. Vol. 8. N 4. P. 1–5.
8. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis // Nat. Methods. 2012. Vol. 9. N 7. P. 676–682.
9. Fernando W.T.L.S. Study on atmospheric pressure plasma jet for plasma patterning toward cell culturing. Doctoral dissertation. Nagaoka institute of Technology, 2020. 133 pp.
10. Васин А.Е. Адаптация инфузорий *Paramecium multimicronucleatum* к солям некоторых тяжелых металлов // Вестн. СамГУ. ест.-науч. сер. 2006. Т. 7. № 47. С. 12–18.
11. Weisse T., Stadler P. Effect of pH on growth, cell volume, and production of freshwater ciliates, and implications for their distribution // Limnol. Oceanogr. 2006. Vol. 51. N 4. P. 1708–1715.
12. Moniruzzaman R., Rehman M.U., Zhao Q.L., Jawaid P., Takeda K., Ishikawa K., Hori M., Tomihara K., Noguchi K., Kondo T., Noguchi M. Cold atmospheric helium plasma causes synergistic enhancement in cell death with hyperthermia and an additive enhancement with radiation // Sci. Rep. 2017. Vol. 7. N 1: 11659.
13. Slaveykova V., Sonntag B., Gutiérrez J.C. Europe PMC Funders group stress and protists: No life without stress // Eur. J. Protistol. 2017. Vol. 55. Pt. A. P. 39–49.

Поступила в редакцию 30.07.2021

После доработки 11.10.2021

Принята в печать 20.10.2021

SHORT COMMUNICATION

Effect of low-temperature atmospheric pressure plasma on *Paramecium caudatum* cell culture

G.A. Gruzdev^{1,*}, O.V. Karpukhina^{2,3}, V.G. Yakunin⁴, A.N. Inozemtsev²,
V.P. Savinov⁴, V.Yu. Timoshenko^{5,6,7}, A.A. Kamensky¹

¹Department of Human and Animal Physiology and ²Department of Higher Nervous Activity, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

³Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Ulitsa Kosygina 4–1, Moscow, 119334, Russia;

⁴Department of Semiconductor Physics and Cryoelectronics and ⁵Department of Low Temperature Physics and Superconductivity, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–2, Moscow, 119234, Russia;

⁶Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 53, Moscow, 119991, Russia;

⁷National Research Nuclear University, Moscow Engineering Physics Institute, Kashirskoe shosse 31, Moscow, 115409, Russia

*e-mail: gleb-neuro.phys@mail.ru

Influence of low-temperature atmospheric pressure plasma generated by a high-resource arc plasmatron in an air mixture with the addition of an inert gas and in pure inert gas on the culture of *Paramecium caudatum* cells was studied. The effect of the plasma composition and the time of its exposure on the level of acidity of the aqueous medium and the nature of cell death was found. The obtained results are discussed taking into account the effect of active radicals formed under the action of a plasma jet, as well as the delayed reaction of cells to plasma exposure.

Keywords: *infusoria, Paramecium caudatum, free radicals, low-temperature plasma, plasmatron, cytotoxic effect*

Funding: Study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number 121032500080-8.

Сведения об авторах

Груздев Глеб Андреевич — аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: gleb-neuro.phys@mail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0161-6347>

Карпукхина Ольга Вячеславовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-28-37; e-mail: karpukhina.msu@yandex.ru

Якунин Валерий Георгиевич — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. кафедры физики полупроводников и криоэлектроники физического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-29-53; e-mail: yug51@bk.ru

Иноземцев Анатолий Николаевич — докт. биол. наук; вед. науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-28-37; e-mail: a_inozemtsev@mail.ru

Савинов Владимир Павлович — докт. физ.-мат. наук, доц. кафедры физики полупроводников и криоэлектроники физического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-29-53; e-mail: savinov1983@yahoo.com

Тимошенко Виктор Юрьевич — докт. физ.-мат. наук, проф. кафедры низких температур и сверхпроводимости физического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-29-53; e-mail: timoshen@physics.msu.ru

Каменский Андрей Александрович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: physiology_human_bio_msu@mail.ru