

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ СКОЛЬЗЯЩЕГО РАЗРЯДА НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ И ГИБЕЛЬ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ МИКРОСОСУДОВ *IN VITRO*

Г.А. Мурадян, Е.С. Гудкова, Е.Д. Хилажева, А.В. Моргун, Н.А. Малиновская, А.Б. Салмина, В.В. Салмин\*

Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; \*эл. почта: vsalmin@gmail.com

Исследованы дозозависимые эффекты воздействия плазмы униполярного наносекундного скользящего разряда над поверхностью культуральной среды в закрытом планшете на клетки церебрального эндотелия *in vitro*. При использовании 24-луночного планшета получена поверхностная плотность энергии плазмы одного импульса 360 мкДж/см<sup>2</sup> при частоте импульсов 100 Гц. Показано, что в плазме скользящего разряда идёт активное возбуждение молекул воздуха, образование положительных ионов азота и кислорода, а также образование угарного газа. В диапазоне плотности доз 0-32 Дж/см<sup>2</sup> были оценены дозозависимые эффекты в 4-12-часовом пострадиационном периоде. Проанализирована гибель клеток с оценкой общего числа клеток, некротизированных клеток, клеток в состоянии апоптоза (экстернализация фосфатидилсерина, межнуклеосомная фрагментация ДНК) и их пролиферативная активность (Кi67-иммунопозитивные клетки). Предварительная оценка тонких дозозависимых эффектов указывает на особенности влияния малых доз <1 Дж/см<sup>2</sup>. В частности, обнаруженная значимая по сравнению с контролем стимуляция пролиферативной активности и преобладание апоптоза над некрозом соответствуют представлениям о молекулярных механизмах действия генерируемых холодной плазмой активных форм кислорода и активных форм азота на клетки.

**Ключевые слова:** неравновесная плазма; активные формы кислорода; активные формы азота; церебральный эндотелий; пролиферация; апоптоз; некроз

**DOI:** 10.18097/PBMC20216702150

### ВВЕДЕНИЕ

Окислительное повреждение биомакромолекул — важный компонент действия на клетки широкого спектра физических, химических и биологических факторов, причем особое значение такие эффекты приобретают в так называемых барьерных тканях. С другой стороны, разработка подходов к управлению состоянием клеток эпителия (например, в контексте регуляции процессов регенерации ткани) и эндотелия (например, в контексте реализации механизмов ангиогенеза) находится в фокусе исследований в течение последних нескольких лет. Прогресс в этом направлении обеспечит формирование принципиально новых подходов к терапии широкого круга заболеваний — инфекционных, нейродегенеративных, онкологических, воспалительных, при которых нарушение проницаемости эпителия и/или эндотелия является ключевым механизмом [1].

В числе факторов, потенциально эффективных в контексте контролируемого управления состоянием клеток эпителия и эндотелия для решения биомедицинских задач, — неравновесная газоразрядная плазма. Неравновесная газоразрядная плазма обладает рядом уникальных физико-химических свойств, позволяющих воздействовать на живые клетки и поверхностные слои биологических тканей заряженными частицами — электронами, ионами, возбужденными атомами и молекулами при минимальном термическом эффекте. Неравновесная газоразрядная плазма способствует формированию различных биологически активных соединений — свободных радикалов, активных форм кислорода (АФК), азотсодержащих молекул —

активных форм азота (АФА) — при использовании открытых разрядов. Помимо этого, газоразрядная плазма является источником электромагнитного излучения широкого спектра — от глубокого ультрафиолетового до инфракрасного. Благодаря этим свойствам неравновесная газоразрядная плазма может найти широкое применение в медицине [2], однако обоснованное и безопасное применение сдерживается малой изученностью механизмов влияния неравновесной газоразрядной плазмы на биологические ткани.

Структурно-функциональная целостность эпителиального и эндотелиального слоя определяется несколькими важными факторами, такими как метаболический статус клеток, эффективность функционирования межклеточных контактов (плотные контакты — tight junctions, щелевые контакты — gap junctions, адгезионные контакты — adhesion junctions), выраженность процессов клеточной гибели (апоптоз, некроз, аутофагия) и пролиферации. С учётом известных механизмов действия, неравновесная газоразрядная плазма может влиять на каждый из перечисленных параметров, однако накопленные экспериментальные данные дают противоречивые результаты [3, 4]. Таким образом, разработка протоколов применения газоразрядной плазмы в медицинской практике требует изучения механизмов её влияния на клетки-мишени, в том числе с использованием современных экспериментальных подходов *in vitro*. Кроме того, особое значение имеет разработка технологий направленного действия на клетки эндотелия для регуляции процессов ангиогенеза *in vitro*. Последнее особенно актуально при решении задач регенеративной медицины

(например, для формирования сосудистой сети с заданной архитектурой для применения в качестве имплантата) [5] или задач моделирования гистогематического барьеров *in vitro* (например, модели гематоэнцефалического барьера, модели гломерулярного фильтра *in vitro*), пригодных для тестирования новых лекарственных препаратов или при конструировании микрофизиологических систем в формате “орган-на-чипе” или “ткань-на-чипе”. В этом контексте особенно интересны недавние результаты японских исследователей, разработавших систему “плазма-на-чипе” на основе неравновесной плазмы для мониторинга в режиме реального времени состояния культивируемых клеток [6].

Механизм действия холодной плазмы чаще всего ассоциируют с эффектами АФК и, в меньшей степени, АФА на биологические объекты. Такие эффекты были продемонстрированы в различных модельных живых системах [7]. В частности, бактерицидное действие неравновесной плазмы ассоциировано с образованием АФК и развитием окислительного стресса (ОС), повреждающего клетки-мишени. Как следствие, в них запускаются механизмы окислительного повреждения макромолекул, например, формирование двуцепочечных разрывов ДНК имеет своим результатом арест клеточного цикла, активацию систем репарации и гибель клетки при невозможности восстановления исходной структуры ДНК. Такое повреждение ДНК при действии неравновесной плазмы инициируется заряженными или нейтральными молекулами, продуцируемыми плазмой в газовой фазе, например, относительно длительно живущими ( $O_3$ ,  $NO$ ,  $NO_2$ ,  $H_2O_2$ ) и коротко живущими ( $OH$ ,  $O$ ), ионами и электронами [8]. Стимулирующий эффект холодной плазмы в отношении генерации АФК в митохондриях имеет своим результатом индукцию апоптоза [9], что рассматривается как один из механизмов противоопухолевой активности холодной плазмы [10], однако в некоторых видах клеток плазма может вызывать гибель, не зависящую от продукции АФК [11]. В целом, холодная плазма является контролируемым источником широкого круга соединений, обладающих прооксидантным действием.

При оценке эффектов холодной плазмы на клетки следует учитывать, какие модельные системы применяются; например, значительная часть работ в этом направлении выполнена на клетках опухолевой природы [12], что зачастую не может быть экстраполировано на клетки, не обладающие клоногенным потенциалом. С учётом доминирующего механизма действия холодной плазмы (с участием АФК), весьма привлекательной модельной системой для оценки влияния плазмы на биологические объекты являются клетки эндотелия и эпителия. Это обусловлено тем, что они (например, церебральные эндотелиоциты) обладают высоким содержанием митохондрий, в физиологических условиях экспонируются к различным уровням кислорода и выполняют функцию барьеров (гистогематических). Именно с применением таких модельных клеточных объектов были получены новые данные об эффектах холодной плазмы:

её проангиогенная активность [13], мутагенная активность и индукция ареста клеточного цикла, влияние на экспрессию генов [14]. Кроме того, использование этих видов клеток актуализирует новые возможности применения неравновесной плазмы для контроля физиологического и патологического ангиогенеза, проницаемости эндотелия при воспалении, управления структурной целостностью эпителия и эндотелия для доставки лекарственных соединений в клетки и ткани. Таким образом, интерес к изучению клеточно-молекулярных механизмов действия холодной плазмы на клетки млекопитающих обусловлен всё более увеличивающимся спектром предложенных применений неравновесной плазмы в медицине, к числу которых относятся индукция свертывания крови при массивных кровотечениях, решение хирургических задач (заживление ран), реализация противоопухолевой активности, инактивация частиц биологического происхождения (биологическая деконтаминация) [12].

С учётом этого, изучение физико-химических механизмов, ассоциированных с влиянием холодной плазмы на клетки *in vitro* — обязательный и необходимый этап в прикладных исследованиях, ориентированных на создание новых медицинских приборов и методов, а также в фундаментальных исследованиях, связанных с изучением действия АФК на живые системы.

Целью настоящей работы было изучение АФК- и АФА-опосредованных эффектов неравновесной (холодной) плазмы в отношении пролиферации и гибели клеток церебрального эндотелия *in vitro*.

## МЕТОДИКА

*Методика обработки культуры клеток плазмой скользящего разряда*

Для формирования плазмы с помощью скользящего разряда нами использован униполярный наносекундный генератор высоковольтных импульсов. Обработку клеток плазмой производили импульсами с частотой 100 Гц при различных экспозициях. Для обработки крышка 24-луночного планшета была модифицирована нанесением токопроводящих полосок с внутренней стороны и сплошного электрода с наружной стороны крышки. На внутреннюю сторону подавались высоковольтные наносекундные импульсы отрицательной полярности, а наружная сторона заземлялась. Оценку поверхностной плотности энергии одного импульса производили с помощью формулы, описывающей энергию озонатора на барьерном разряде [15].

$$E = 2U(U_0 - U)C_b\xi = 3,61 \times 10^{-4} \text{ Дж/см}^2$$

При этом были использованы данные по величине максимального импульсного напряжения  $U_0=40$  кВ, импульсное напряжение зажигания разряда  $U=8$  кВ.

Величину ёмкости единицы площади  $C_b$  рассчитывали с учётом следующих параметров: толщина диэлектрического барьера  $d=2$  мм, значение диэлектрической проницаемости для плотного

полистирола принимали равным  $\epsilon=2,5$ . Геометрический фактор заполнения поверхности плазмой  $\xi=0,63$  (квадрат, вписанный в окружность).

Излучение плазмы направлялось с помощью оптического световода в миниспектрометр Qmini VIS (“RGB Photonics”, Германия). Для оптимизации отношения сигнал/шум накопление сигнала происходило сериями по 4 с с 4 с накоплением темного сигнала. Включение и выключение генератора импульсов осуществляли синхронно. Идентификацию спектральных линий осуществляли с помощью электронной базы данных спектральных линий электронных переходов атомов и молекул [16].

Источником церебральных эндотелиоцитов служили крысы 10-дневного возраста линии Wistar. Выделение и культивирование клеток производили по протоколу [17]. После декапитации извлекали головной мозг, удаляли оболочки и крупные поверхностные сосуды. Отделяли кору головного мозга и нарезами на кусочки 1 мм<sup>3</sup>, после чего центрифугировали в течение 3 мин при 150 g. После удаления супернатанта к осадку добавляли 25% фетальную бычью сыворотку (FBS) (“HyClone”, США), проводили тритурацию и центрифугировали 10 мин при 600 g. Удаляли супернатант и повторяли процедуру с добавлением 25% FBS, тритурированием и центрифугированием. Осадок собирали и добавляли 1 мл 0,1% коллагеназы II (“ПанЭко”, Россия). Ферментативная обработка длилась 35 мин при 37°C в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (5% CO<sub>2</sub>) с периодическим перемешиванием. После ферментативной обработки к суспензии добавляли двойной объем питательной среды, ресуспендировали и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин. Питательная среда состояла из DMEM с добавлением 20% FBS (“HyClone”), 0,58 мг/мл глутамин (“ПанЭко”) и антибиотика (100 ЕД/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, “ПанЭко”). Эндотелиоциты в количестве 5×10<sup>5</sup> вносили на дно 24-луночного планшета. Клетки инкубировали в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (“Binder”, Германия) при 5% CO<sub>2</sub> и 37°C. Сформированы контрольная группа клеток (без воздействия) и опытная (воздействие плазмой с разной экспозицией).

*Методики оценки клеточных эффектов действия плазмы скользящего разряда*

Пролиферативную активность клеток эндотелия оценивали после обработки неравновесной плазмой скользящего разряда с экспозициями 10 с, 20 с, 40 с, 80 с, 160 с с помощью анализа экспрессии Ki67. Через 4 ч после воздействия на клетки плазмой проводили иммуоцитохимическую регистрацию маркера пролиферативной активности клеток. Оценку экспрессии маркера пролиферативной активности (Ki67) культивируемых эндотелиоцитов проводили по стандартной методике последовательного комбинированного окрашивания препарата. Первичные антитела (“Abcam”, США) в рабочем разведении (1:200) добавляли к культуре клеток и инкубировали в течение 16 ч при 5°C во влажной камере. Затем, после отмывки, в темноте вносили вторичные антитела,

меченые флуорохромом Alexa Fluor-488 (“Abcam”), в рабочем разведении (1:300) и осуществляли инкубацию при 37°C во влажной камере в течение 2 ч. В процессе окрашивания осуществляли двукратную отмывку образцов от антител в течение 5 мин в фосфатно-солевом буфере (PBS).

Оценку гибели клеток осуществляли при экспозициях 75 с, 150 с, 300 с, 600 с, 900 с. Контрольной группе присвоено время облучения 0 с. Оценку гибели клеток (выявление апоптоза, некроза и вторичного некроза путём визуализации связывания аннексина V с фосфатидилсеринем клеточной мембраны) проводили с использованием набора “Annexin V-FITC Apoptosis Staining/Detection Kit” (ab14085, “Abcam”) на нефиксированных клетках. Из культурального планшета убрали клеточную среду, заменяли её на раствор Annexin V Binding Buffer (по 200 мкл в лунку), затем в каждую лунку вносили по 2 мкл Annexin V-FITC и Propidium Iodide, инкубировали 5 мин в темноте, после чего проводили однократную отмывку PBS с кальцием и магнием и микроскопировали.

Анализ вхождения клеток в состояние апоптоза также осуществлялся во второй серии опытов с применением экспозиций 10 с, 20 с, 40 с, 80 с и 160 с. Контрольной группе присвоено время облучения 0 с. После обработки плазмой через 24 ч инкубации клетки анализировались по методике TUNEL. Детекцию апоптоза методом TUNEL (оценка поздних событий апоптоза — межнуклеосомной фрагментации ДНК) проводили с использованием набора “TUNEL Assay Kit — FITC” (ab66108, “Abcam”) на фиксированных клетках. После фиксации клетки отмывали дважды раствором Wash Buffer по 2 мин, далее добавляли окрашивающий раствор (в лунку по 204 мкл), содержащий 40 мкл Reaction Buffer, 3 мкл TdT Enzyme, 32 мкл FITC-dUTP, 129 мкл дистиллированной воды, инкубировали с ним клетки 1 ч при 37°C. Затем клетки отмывали однократно раствором Rinse Buffer в течение 5 мин, вносили в каждую лунку по 200 мкл раствора Propidium Iodide/RNase A, инкубировали в темноте 30 мин при комнатной температуре, проводили однократную отмывку раствором PBS с кальцием и магнием и микроскопировали.

Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE (“Bio-Rad”, США). Подсчёт относительного количества клеток, экспрессирующих целевую метку, выполняли в 5 полях зрения для оценки апоптоза методом Annexin V, в 10 полях зрения для иммуногистохимии (Ki67+), в 15 полях зрения для оценки апоптоза методом TUNEL. Анализ изображений проводили с применением пакета программного обеспечения ImageJ версия 1.47 (“Research Services Branch”, США) и разработанного нами плагина для пакетной обработки [18].

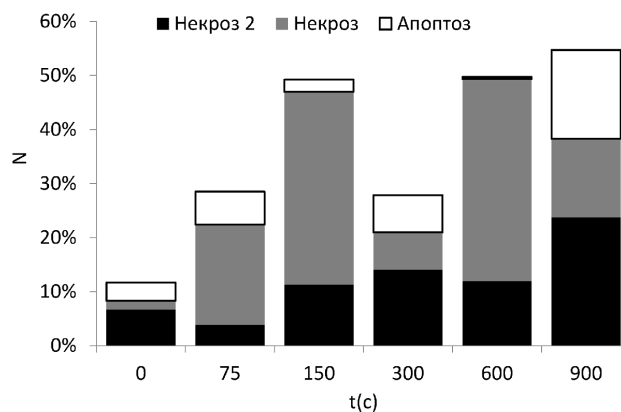
*Статистический анализ*

Статистический анализ проводили с использованием методов описательной и непараметрической статистики. Использовался статистический пакет Statsoft Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для подтверждения феномена генерации холодной плазмы в заданных условиях эксперимента молекул с прооксидантной активностью, способных инициировать повреждение биомакромолекул в клетках-мишенях, мы проанализировали обзорный эмиссионный спектр скользящего разряда в сухом планшете для культивирования клеток. Нами идентифицированы в диапазоне 360-760 нм 114 линий электронно-колебательных переходов  $N_2$ ,  $O_2$ . Кроме того, идентифицированы линии ионов, атомов и молекул, сформированных в плазме разряда (таблица). Наличие атомарных ионов азота в плазме скользящего разряда и атомов кислорода свидетельствует об интенсивной диссоциации указанных молекул. Рекомбинация ионов азота может приводить к формированию оксидов азота различной валентности. Рекомбинация атомов кислорода и наличие в разряде паров воды способны индуцировать формирование АФК. Среди продуктов плазмохимических реакции в атмосферной плазме наиболее важное значение имеют долгоживущие соединения, обладающие хорошей растворимостью в воде. К числу последних можно отнести перекись водорода, супероксид-анион, нитрит- и нитрат-анионы, пероксинитрит-анион [19]. Образование нитрат- и нитрит-анионов в воде, обработанной плазмой скользящего разряда в используемом планшете, было также подтверждено нами с помощью капиллярного электрофореза (данные не представлены). Таким образом, накопление в культуральной среде АФК и АФА под действием скользящего разряда подтверждается общими механизмами их образования, а также прямыми и косвенными измерениями.

Повреждение клеток при действии внешних факторов, обладающих прооксидантной активностью, может быть оценено несколькими способами, в числе которых — анализ выраженности основных видов клеточной гибели - некроза и апоптоза. На рисунке 1 представлена экспозиционная диаграмма вариантов гибели эндотелиоцитов при действии плазмы скользящего разряда, полученная методом детекции экстернализации фосфатидилсерина в апоптотических клетках. Обращает на себя внимание то, что выход



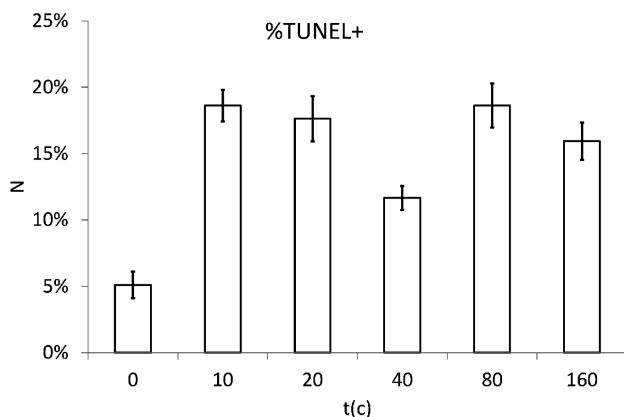
**Рисунок 1.** Распределение видов клеточной гибели в зависимости от экспозиции обработки плазмой скользящего разряда культуры эндотелиоцитов, определённых методом связывания Annexin V.

на “плато” суммарной гибели клеток происходит при экспозициях 150 с, что в соответствии с оценкой дозы составляет 5 Дж/см<sup>2</sup>. При этом соотношение разных видов клеточной гибели меняется во всём диапазоне исследованных доз, что особенно наглядно в ситуации с развитием апоптоза.

Поскольку тест с аннексином V регистрирует начальные и обратимые стадии апоптоза, мы далее оценили накопление маркеров межнуклеосомной фрагментации ДНК (метод TUNEL), которая характеризует необратимую стадию запрограммированной клеточной гибели, при действии холодной плазмы в малых дозах. Зависимость от экспозиции доли клеток в состоянии апоптоза представлена на рисунке 2. Обращает на себя внимание то, что даже при минимальных экспозициях  $t=10$  с ( $E=0,33$  Дж/см<sup>2</sup>) регистрируется значимое отличие доли апоптотических клеток ( $p<10^{-5}$ ) от контрольной группы, а дальнейшее увеличение экспозиции не имеет значимой корреляционной зависимости от дозы  $r<0,04$ . Таким образом, можно говорить о “триггерном характере” воздействия неравновесной плазмы на запуск программы апоптоза, а поиск пороговой экспозиции является самостоятельной задачей.

**Таблица.** Электронные линии атомов, ионов и продуктов плазмохимических реакций, зарегистрированных в плазме скользящего разряда

$\lambda$ (nm)	Частица	Переход	( $v' - v''$ ), ( $J' - J''$ )
567,83	$O_2^+$	$A^2\Pi_u - X^2\Pi_g$	1 — 14
623,27	$O_2^+$	$b^4\Sigma_u - a^4\Pi_u'$	3 — 4
653,18	$O_2^+$	$A^2\Pi_u - X^2\Pi_g$	0 — 15
604,479	C	$3p^1D - 9s^1P_0$	2 — 1
643,345	$N^+$	$2p3^3S_0 - 3p^3P$	1 — 2
650,4608	$N^+$	$3d^3D_0 - 4p^3D$	3 — 3
683,4094	$N^+$	$3d^3P_0 - 4p^3S$	1 — 1
700,1915	O	$3p^3P - 4d^3D_0$	1 — 2,1
721,506	$N^+$	$3d^3P_0 - 4p^3D$	1 — 2
755,25	CO	$a^3\Sigma - a^3\Pi$	4 — 1



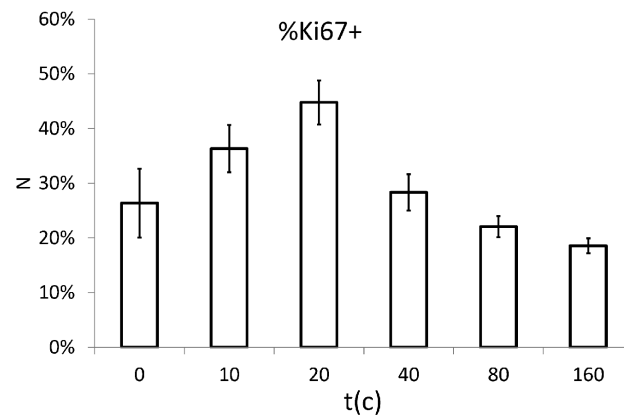
**Рисунок 2.** Зависимость доли клеток в состоянии апоптоза от экспозиции обработки плазмой скользящего разряда культуры эндотелиоцитов, определённых методом TUNEL.

Зависимость количества клеток в состоянии митоза (Ki67+) от времени экспозиции холодной плазмы представлена на рисунке 3. Очевидно наличие максимума доли клеток, вступивших в пролиферацию, при 20-секундной экспозиции, что соответствует плотности дозы  $E=0,66$  Дж/см<sup>2</sup>. Следовательно, плазма скользящего разряда способна стимулировать пролиферативную активность эндотелиоцитов.

## ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке генерируемых холодной плазмой соединений мы установили, что основной вклад в реализацию её биологического эффекта в использованной модельной системе вносят АФК и АФА, однако, помимо короткоживущих ионов и атомов азота и кислорода, в разряде идёт формирование также молекул угарного газа. Линии озона, перекиси водорода и оксидов азота в исследуемой области спектра не идентифицированы, поскольку являются слабыми или маскируются линиями мажорных частиц, однако формирование этих частиц в плазме барьерного разряда является хорошо установленным фактом. Наличие линии угарного газа возможно из-за присутствия в воздухе углекислого газа, а также из-за плазмохимической эрозии полистирола планшета.

Очевидно, что по мере увеличения экспозиции нарастает количество клеток в состоянии некроза и пропорционально уменьшается доля жизнеспособных клеток в популяции. Полученные данные позволяют идентифицировать безопасные, с точки зрения индукции некроза, времена экспозиции холодной плазмы. Кроме того, необходимо иметь в виду, что основным механизмом развития некроза при действии внешних факторов является аккумуляция АФК и повреждение клеточных мембран [20]. В таком случае, полученные нами результаты косвенно подтверждают гипотезу о существенном вкладе АФК и АФА в действие неравновесной плазмы на клетки эндотелиальной природы.



**Рисунок 3.** Зависимость доли Ki67+ клеток от экспозиции обработки плазмой скользящего разряда культуры эндотелиоцитов.

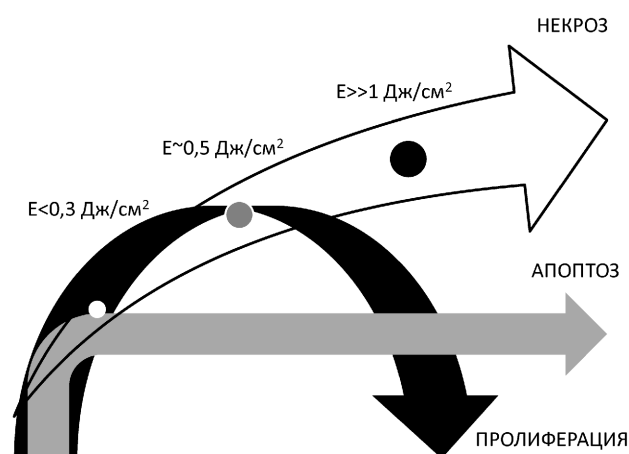
Известно, что АФК и АФА могут влиять и на развитие другой формы клеточной гибели — апоптоза, но то, какой механизм будет “выбран” клеткой, определяется несколькими важными обстоятельствами: 1) доза действующего агента: малые дозы обычно инициируют апоптоз, высокие — подавляют апоптоз (именно это характерно для АФК с учётом редокс-чувствительности каспаз — ключевых ферментов апоптоза) и индуцируют некроз; 2) вид АФК: например, в культивируемых нейронах супероксидный анион-радикал и синглетный кислород инициируют развитие апоптоза, а перекись водорода — развитие некроза [21], причём последний эффект реализуется через гиперпродукцию АФК в митохондриях клеток-мишеней [22].

Мы установили, что выход на насыщение индукции апоптоза находится на меньших значениях экспозиции неравновесной плазмы по сравнению с некрозом, а в диапазоне доз, которые характеризовались максимально некроз-индуцирующей активностью, мы зарегистрировали супрессию апоптоза. Это полностью соответствует описанным выше закономерностям: в меньших дозах неравновесная плазма инициирует процессы запрограммированной клеточной гибели, а в больших дозах — индуцирует некроз. Такие взаимозависимости являются доказательством участия АФК в механизме повреждающего действия неравновесной плазмы на клетки эндотелия. Так, ранее было установлено, что индукторы окислительного и нитрозативного стресса способны индуцировать апоптоз в малых дозах, некроз — в больших, последнее связывают с подавлением активности эффекторных молекул апоптоза (например, каспаз) вследствие их окислительного повреждения [22, 23].

Оценка количества Annexin V+PI- клеток (апоптоз), Annexin V-PI+ клеток (некроз), Annexin V+/PI+ клеток (вторичный некроз) показала, что результатом действия холодной плазмы на клетки в широком диапазоне доз является нестабильность соотношения этих категорий при каждом последующем увеличении дозы. Очевидно, что такой эффект

может быть следствием того, что экстернализация фосфатидилсерина характеризует начальные этапы клеточной гибели и, как известно, носит обратимый характер [24]. Иными словами, невозможность реализовать программу апоптоза приводит к индукции вторичного некроза либо к возвращению клеток в исходное (неповреждённое) состояние за счёт восстановления физиологической асимметрии липидного бислоя мембраны. Анализ эффектов холодной плазмы как индуктора специфичной для апоптоза межнуклеосомной фрагментации ДНК выявил, что действуя в малых дозах, неравновесная плазма индуцирует повреждение клеток по “триггерному” механизму: низкие дозы инициируют апоптоз, а дополнительное увеличение дозы никак не сказывается на количестве клеток, реализующих этот вариант клеточной гибели. Фактически это значит, что при действии холодной плазмы начальные (обратимые) механизмы повреждения мембраны реализуются в большинстве аффецированных клеток, а завершение программы апоптоза возможно лишь в тех клетках в популяции, которые имеют высокую чувствительность к действию повреждающего агента.

Кроме того, мы обнаружили, что в тех же дозах, которые обладают умеренной некроз-индуцирующей и выраженной апоптоз-индуцирующей активностью, неравновесная плазма вызывает интенсификацию экспрессии Ki67 в клетках церебрального эндотелия *in vitro*. АФК могут индуцировать пролиферацию клеток, несмотря на индукцию клеточной гибели, что сопровождается увеличением экспрессии Ki67 в популяции [25]. Известно, что церебральные эндотелиоциты, находясь в оптимальных условиях культивирования *in vitro*, обладают пролиферативной активностью, что может быть зарегистрировано по экспрессии ими маркера пролиферации Ki67. Во время интерфазы этот белок локализуется в пределах ядра (он необходим в этот период для редислокации гетерохроматина и ассоциации ядрышка с гетерохроматином), а во время митоза он тесно связан с хромосомами, формируя так называемый перихромосомный слой рибонуклеопротеинов, обеспечивающий конденсацию хромосом [26]. Отсутствие экспрессии Ki67 во время G<sub>0</sub> фазы клеточного цикла (покоящиеся клетки, не вступающие в митоз) позволяет использовать его детекцию в качестве достоверного маркера пролиферативного статуса клеток [27]. Ранее было показано, что увеличение экспрессии Ki67 в клетках эндотелия церебральных микрососудов ассоциировано с процессами ангиогенеза [28]. Есть данные о том, что в клетках с индуцированным апоптозом может регистрироваться высокая экспрессия Ki67, причём увеличенный уровень экспрессии Ki67 соответствует высокой чувствительности к действию индукторов апоптоза [29]. В таком случае, обнаруженные нами эффекты малых доз холодной плазмы (индукция и завершение программы апоптоза на фоне высокой экспрессии в клетках Ki67) являются дополнительным подтверждением вклада АФК в указанные события: увеличение уровня АФК



**Рисунок 4.** Дозозависимые тренды для некроза, апоптоза, пролиферации после обработки плазмой скользящего разряда культуры эндотелиоцитов.

сенситизирует клетки к действию апоптогенных стимулов, как это было показано, например, для провоспалительных цитокинов [30].

В целом, закономерности влияния холодной плазмы на пролиферацию и гибель клеток церебрального эндотелия соответствуют характеристикам АФК- и АФА-опосредованных эффектов, результатом чего может быть либо повреждение клеток эндотелия, либо стимуляция их пролиферативной активности (рис. 4).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

При анализе эффектов холодной плазмы на клетки церебрального эндотелия *in vitro* мы зарегистрировали выраженное апоптогенное, некроз-индуцирующее и митогенное действие плазмы униполярного высоковольтного наносекундного скользящего разряда в воздухе над поверхностью культуральной среды с частотой следования импульсов до 100 Гц в отношении культивируемых клеток церебрального эндотелия *in vitro*. Значимые эффекты в интервале 4-12 ч после плазменной обработки наблюдаются уже при дозах 1 Дж/см<sup>2</sup>. Очевидно, что это вполне соотносится со спектром генерируемых холодной плазмой АФК и АФА, для действия которых характерны дозозависимые эффекты, зарегистрированные нами: при действии малых доз холодной плазмы (<1 Дж/см<sup>2</sup>) обнаруживается значимая по сравнению с контролем стимуляция пролиферативной активности и преобладание апоптоза над некрозом.

Зарегистрированные нами закономерности индукции некроза, индукции и подавления (в дозозависимой манере) апоптоза, индукции и подавления (в дозозависимой манере) пролиферации клеток церебрального эндотелия свидетельствуют о том, что неравновесная (холодная) плазма может проявлять цитотоксическое действие, стимулировать пролиферацию клеток, что соответствует представлениям о молекулярных механизмах действия АФК и АФА на клетки, обладающие пролиферативным потенциалом.

Необходимо отметить, что влияние неравновесной плазмы на состояние клеток эндотелия микрососудов головного мозга зависит от условий формирования разряда и времени экспонирования, что позволяет использовать генератор холодной плазмы как контролируемый источник АФК и АФА в биомедицинских исследованиях и разработках. Кроме того, наши результаты свидетельствуют о том, что применение клеток эндотелия церебральных микрососудов в составе моделей гематоэнцефалического барьера *in vitro* и подбор соответствующих условий воздействия сможет обеспечить управление механизмами ангиогенеза и структурно-функциональной целостности барьера при сохранении жизнеспособности клеток. Таким образом, можно существенно расширить области применения источников неравновесной плазмы для управления структурно-функциональной целостностью барьерных тканей, в том числе в составе гистогематических барьеров *in vivo* и *in vitro*.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Минздрава России в рамках государственного задания (№ АААА-А19-119060690006-0).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных проведены в соответствии с общепринятыми этическими международными нормами с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС) и требованиями приказа Минздрава России № 267 от 19.06.2003 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Rajabi M., Mousa S. (2017) *Biomedicines*, **5**(2), 34. DOI: 10.3390/biomedicines5020034.
- Keidar M. (2015) *Plasma Sources Science Technology*, **24**(3), 033001. DOI: 10.1088/0963-0252/24/3/033001.
- Hasse S., Duong Tran T., Hahn O., Kindler S., Metelmann H.-R., von Woedtke T., Masur K. (2016) *Clin. Exp. Dermatol.*, **41**(2), 202-209. DOI: 10.1111/ced.12735.
- Karki S.B., Yildirim-Ayan E., Eisenmann K.M., Ayan H. (2017) *BioMed Res. Int.*, **2017**, 8058307. DOI: 10.1155/2017/8058307.
- Rouwkema J., Khademhosseini A. (2016) *Trends Biotechnol.*, **34**(9), 733-745.
- Oh J.-S., Kojima S., Sasaki M., Hatta A., Kumagai S. (2017) *Sci. Rep.*, **7**, 41953. DOI: 10.1038/srep41953.
- López M., Calvo T., Prieto M., Múgica-Vidal R., Muro-Fraguas I., Alba-Eliás F., Alvarez-Ordóñez A. (2019) *Front. Microbiol.*, **10**, 622. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00622.
- Kalghatgi S., Kelly C.M., Cerchar E., Torabi B., Alekseev O., Fridman A., Friedman G., Azizkhan-Clifford J. (2011) *PloS One*, **6**(1), e16270. DOI: 10.1371/journal.pone.0016270.
- Li W., Yu K.N., Ma J., Shen J., Cheng C., Zhou F., Cai Z., Han W. (2017) *Arch. Biochem. Biophys.*, **633**, 68-77.
- Tanaka H., Mizuno M., Ishikawa K., Toyokuni S., Kajiyama H., Kikkawa F., Hori M. (2018) *Biol. Chem.*, **400**(1), 87. DOI: 10.1515/hsz-2018-0199.
- Conway G.E., Casey A., Milosavljevic V., Liu Y., Howe O., Cullen P.J., Curtin J.F. (2016) *Br. J. Cancer*, **114**(4), 435-443.
- Lin L., Wang L., Liu Y., Xu C., Tu Y., Zhou J. (2018) *Oncology Reports*, **40**(6), 3405-3415.
- Arjunan K.P., Friedman G., Fridman A., Clyne A.M. (2012) *J. R. Soc. Interface*, **9**(66), 147-157.
- Schmidt A., Wende K., Bekeschus S., Bundscherer L., Barton A., Ottmuller K., Weltmann K.D., Masur K. (2013) *Free Radic. Res.*, **47**(8), 577-592.
- Самойлович В.Г., Гибалов В.И., Козлов К.В. (1989) *Физическая химия барьерного разряда*, МГУ, 176 с. [Samoilovich V.G., Gibalov V.I., Kozlov K.V. (1989) *Fizicheskaya Khimiya Bar'ernogo Razryada*. Moscow, MGU, 176 p.]
- Салмин В.В., Гудкова Е.С., Мурадян Г.А. (2020) *База данных электронных спектров испускания атмосферных газов в диапазоне длин волн 360-750 нм с разрешением 0,1 нм при возбуждении барьерным разрядом*, RU 2020620129. [Salmin V.V., Gudkova Ye.S., Muradyan G.A. (2020) *Baza dannykh elektronnykh spektrov ispuskaniya atmosferynykh gazov v diapazone dlin voln 360-750 nm s razresheniym 0,1 nm pri vzbuzhdenii bar'yernym razryadom*, RU 2020620129.]
- Liu Y., Xue Q., Tang Q., Hou M., Qi H., Chen G., Chen W., Zhang J., Chen Y., Xu X. (2013) *Microvasc. Res.*, **90**, 199-205.
- Салмин В.В., Салмина А.Б., Моргун А.В. (2020) *Плагин для программы ImageJ для подсчёта флуоресцентных меток на микрофотографиях*, RU 2020612777. [Salmin V.V., Salmina A.B., Morgun A.V. (2020) *Plagin dlya programmy ImageJ dlya podscheta fluorescentnykh metok na mikrofotoografiyah*, RU 2020612777].
- Piskarev I., Astaf'eva K., Ivanova I. (2017) *Biophysics*, **62**(4), 547-552.
- Festjens N., Vanden Berghe T., Vandenabeele P. (2006) *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1757**(9), 1371-1387.
- Valencia A., Moran J. (2004) *Free. Radic. Biol. Med.*, **36**(9), 1112-1125.
- Choi K., Ryu S., Song S., Choi H., Kang S., Choi C. (2010) *Cell Death Differentiation*, **17**(5), 833-845.
- Hampton M.B., Fadeel B., Orrenius S. (1998) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **854**(1), 328-335.
- Geske F., Lieberman R., Strange R., Gerschenson L. (2001) *Cell Death Differentiation*, **8**(2), 182-191.
- Michael O.O., Gbolahan B.W., Ansa C.E., Abdulbasitand A., Azeez I.O. (2015) *Ann. Neurosci.*, **22**(3), 150-161.
- Sun X., Kaufman P.D. (2018) *Chromosoma*, **127**(2), 175-186.
- Scholzen T., Gerdes J. (2000) *J. Cell. Physiol.*, **182**(3), 311-322.
- Boitsova E.B., Morgun A.V., Osipova E.D., Pozhilenkova E.A., Martinova G.P., Frolova O.V., Olovannikova R.Y., Tohidpour A., Gorina Y.V., Panina Y.A., Salmina A.B. (2018) *J. Neuroinflamm.*, **15**(1), 196. DOI: 10.1186/s12974-018-1233-2.
- Baisch H. (2002) *Cell Proliferation*, **35**(6), 333-342.
- Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A. (2016) *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1863**(12), 2977-2992.

Поступила в редакцию: 26. 01. 2021.  
После доработки: 09. 03. 2021.  
Принята к печати: 18. 03. 2021.

**EFFECT OF SLIDING DISCHARGE ON PROLIFERATION AND DEATH  
OF BRAIN MICROVESSEL ENDOTHELIAL CELLS *IN VITRO***

**G.A. Muradyan, E.S. Gudkova, E.D. Khilazheva, A.V. Morgun, N.A. Malinovskaya, A.B. Salmina, V.V. Salmin\***

Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University,  
1 P. Zheleznyaka str., Krasnoyarsk, 660022 Russia;\*e-mail: vsalmin@gmail.com

The dose-dependent effects of plasma exposure to a unipolar nanosecond sliding discharge over the surface of the culture medium in a closed plate on the cells of cerebral endothelium *in vitro* were studied. Using a 24-well plate, the surface plasma energy density of one pulse was  $360 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  at a pulse frequency of 100 Hz. It has been shown that in the creeping discharge plasma there is an active excitation of air molecules, the formation of positive nitrogen and oxygen ions, and the formation of carbon monoxide. In the dose density range of  $0\text{-}32 \text{ J}/\text{cm}^2$ , the dose-dependent effects were assessed in the 4-12 h post-radiation period. Cell death was analyzed with an assessment of the total number of cells, necrotic cells, cells in apoptosis (phosphatidylserine externalization, internucleosomal DNA fragmentation) and their proliferative activity (Ki67-immunopositive cells). A preliminary assessment of subtle dose-dependent effects indicates the peculiarities of the effect of small doses  $<1 \text{ J}/\text{cm}^2$ . In particular, the observed stimulation of proliferative activity, which is significant in comparison with the control, and the predominance of apoptosis over necrosis, is consistent with the concept of the molecular mechanisms of action of reactive oxygen species and reactive nitrogen species generated by cold plasma on cells.

**Key words:** non-equilibrium plasma; reactive oxygen species; cerebral endothelium; proliferation; apoptosis; necrosis

**Funding.** The study was performed by the State Assignment for Research, Ministry of Public Health of Russian Federation (no. AAAA-A19-119060690006-0).

Received: 26.01.2021, revised: 09.03.2021, accepted: 18.03.2021.