

УДК 57.03 + 579.6 + 57.033 + 57.036 + 57.042 + 615.03

ВОЗДЕЙСТВИЕ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ ГАЗОВОГО РАЗРЯДА АТМОСФЕРНОГО ДАВЛЕНИЯ НА КЛЕТКИ + *PARAMECIUM CAUDATUM* ПРИ ИЗУЧЕНИИ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ МЕКСИДОЛА

© 2025 г. Г. Н. Абрашитов^{а, *}, Г. А. Груздев^а, В. Г. Якунин^б,
В. П. Савинов^б, О. В. Карпухина^{а, с}, В. Ю. Тимошенко^{б, d}

^аБиологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, 119991 Россия

^бФизический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^сФедеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова
Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

^dНациональный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва, 115409 Россия

*E-mail: gleb58a@mail.ru

Поступила в редакцию 30.05.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 12.06.2023 г.

Исследованы антиоксидантные цитопротекторные свойства мексидола при воздействии аргоновой и гелиевой газоразрядной холодной плазмы атмосферного давления на культуру клеток *Paramecium caudatum*. Установлено, что мексидол практически полностью устраняет негативные эффекты окислительного стресса после плазменного воздействия, сохраняя 100% численности клеток. Полученные данные о различных поведенческих реакциях клеток подтверждают практическую ценность использованных одноклеточных организмов в качестве модельных объектов для фармакологических и токсикологических исследований, а применение газоразрядной холодной плазмы позволяет исключить прямое окислительное действие пероксида водорода (стандартная модель окислительного стресса) на исследуемые препараты и повысить достоверность токсикологических исследований.

Ключевые слова: *paramecium caudatum*, мексидол, цитопротекция, газовый разряд, холодная плазма

DOI: 10.56304/S2079562924050014

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что воздействие низкотемпературной плазмы, получаемой с помощью относительно компактных источников (плазмотронов), способно активировать окислительный стресс у клеток и одноклеточных организмов, который приводит к их гибели. В качестве биологического объекта для изучения лекарственных препаратов, способных нейтрализовать окислительные эффекты, интересен одноклеточный эукариотический организм *Paramecium caudatum*. Данное простейшее легко содержать в лабораторных условиях, поддерживая большую численность клеток без затрат времени на воспроизводство и значительных материальных затрат. Также этот объект исследования можно назвать “плавающим нейроном”, исходя из его электрофизиологических свойств и способности к раздражимости под влиянием разных факторов среды [1].

Ранее при изучении влияния низкотемпературной плазмы атмосферного давления на клетки

Paramecium caudatum было показано, что воздействие плазмы на клетку вызывает гибель организма в зависимости от времени воздействия и газового состава [2]. Эти данные позволили по-новому взглянуть на изучение антиоксидантной активности разных групп фармакологических препаратов в условиях окислительного стресса. Возможно, применение низкотемпературной плазмы при исследовании действия окислительного стресса на клетки будет более показательным, чем в экспериментальных работах, где в качестве повреждающего агента использовалась перекись водорода [3].

Целью нашей работы было оценить возможность изучения антиоксидантных свойств веществ, при воздействии аргоновой и гелиевой низкотемпературной плазмы атмосферного давления на модельном одноклеточном организме *Paramecium caudatum*.

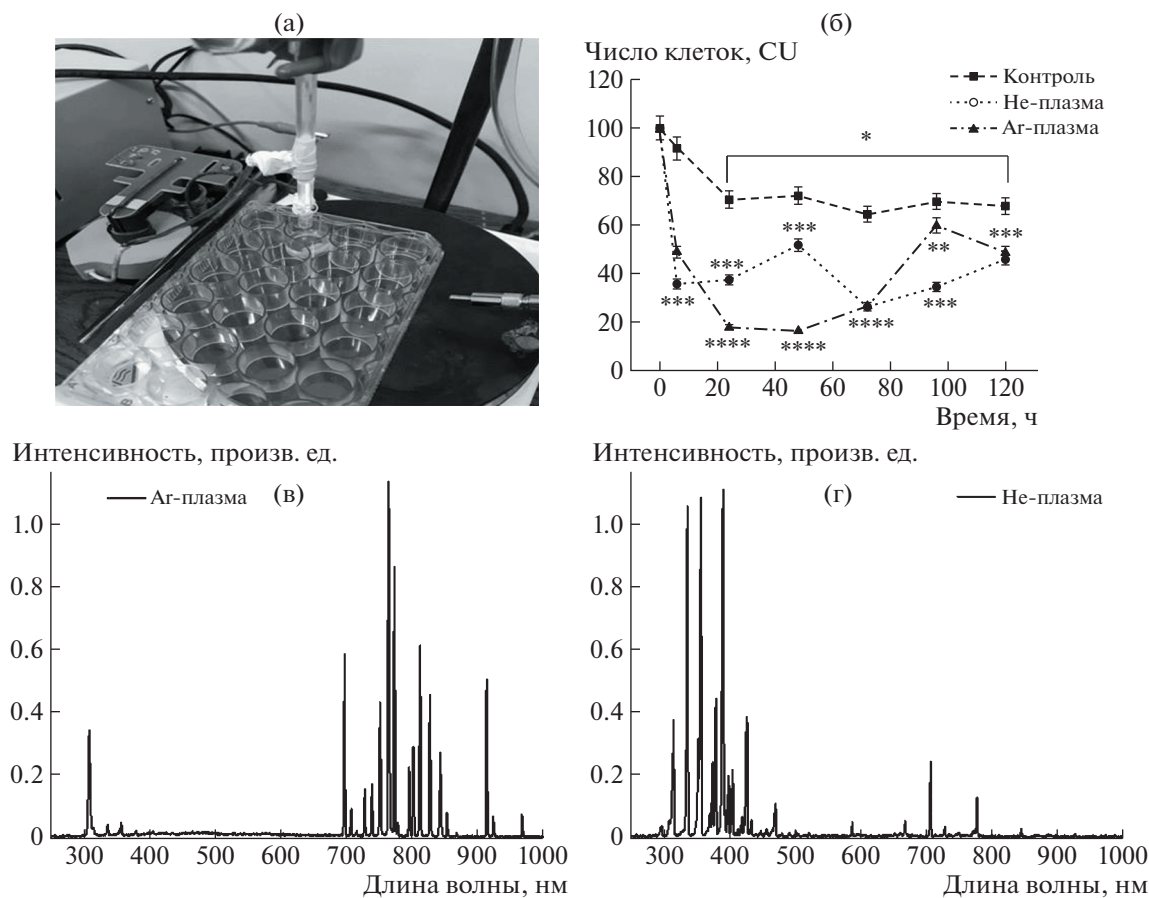


Рис. 1. Установка для проведения экспериментов, общие закономерности влияния низкотемпературной плазмы аргона и гелия на клеточную культуру *Paramecium caudatum* и спектры свечения плазмы у поверхности планшета с клетками: (а) установка по воздействию низкотемпературной плазмы на клетки; (б) зависимость от времени числа клеток, выживших после плазменного воздействия, где контроль — группа без воздействия плазмы ($p < 0.05$; * $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.00005$); (в) спектр свечения низкотемпературной аргоновой плазмы; (г) спектр свечения низкотемпературной гелиевой плазмы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на стерильной культуре живых клеток *Paramecium caudatum*. Инфузории содержали в условиях, приближенных к естественным условиям их среды обитания: температура воды 22°C , $\text{pH} = 6.8\text{--}7.2$, с соблюдением 12 часового светового дня. Плотность популяции клеток в маточной культуре поддерживали в пределах 1000 клеток/мл. Кормление инфузорий производили ежедневно раствором дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в объеме 200 мкл на колонию в 100 мл. Для предотвращения нарушения стерильности среды ежемесячно проводили фильтрацию колонии через мелкодисперсную губку. В дни эксперимента кормление инфузорий не проводилось.

В исследовании проведены две серии эксперимента: в 1-й серии использовали He-плазму, во 2-й серии — Ar-плазму. Воздействие плазмы осуществлялось с использованием плазматрона

(генератора холодной плазмы). Данный источник плазмы включает генератор переменного напряжения 30 кГц, подключенный к выходному каскаду в виде высоковольтного сетевого трансформатора, с которого напряжение около 30 кВ подается на разрядный промежуток. Плазменная струя формировалась в потоке газа (аргон или гелий) с расходом 3 л/мин. Плазменное воздействие на культуру клеток проводилось в течение пяти минут. В установку были добавлен оптический спектрометр ATP2400 (OptoSky Inc.) с оптоволоконным кварцевым вводом излучения и спектральным разрешением 1 нм в диапазоне 200–1000 нм для регистрации интенсивности свечения плазменной струи у поверхности планшета с исследуемыми клеточными культурами (рис. 1а).

Цитопротекторный эффект антиоксидантных препаратов изучался на примере мексидола (этилметилгидроксипиридина сукцинат, Фармасофт, Россия), взятого в концентрации 0.05 мг/мл

($3 \cdot 10^{-7}$ М) — соответствует терапевтическим концентрациям, применяемым в медицинской практике.

Воздействовали низкотемпературной плазмой на культуру клеток через одну минуту после введения препаратов в среду. Регистрацию численности клеток производили на оптическом микроскопе Olympus SZ-6 спустя четыре часа после воздействия, а далее каждый день в течение семи дней для каждой из групп. Для обработки видеозаписей использовали программу ImageJ (Fiji) с плагином “counting cell” [4].

Статистический анализ проводили в программе “Statistica 10” с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни, поскольку выборки данных не соответствовали нормальному закону распределения критерию Шапиро–Вилка. Достоверность отличий считалась при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При воздействии низкотемпературной плазмой на *Paramecium caudatum* наблюдалось значительное снижение численности клеток. Для аргоновой плазмы такое уменьшение составляло до 80% от общего количества клеток, в то время как смертность клеток после воздействия гелиевой плазмы составляла 60% (рис. 1б). Оба показателя оценены для первых суток после воздействия. На 5 день регистрации численности колонии в каждой из опытных групп число клеток составляло 50% от общего количества, что свидетельствует о пролонгированном воздействии как аргоновой, так и гелиевой плазмы на клетки.

При регистрации свечения аргоновой плазмы помимо линий, непосредственно относящихся к ионам аргона были отмечены линии радикалов N_2 , NO и OH, чьи частоты излучения расположены в интервале от 300 до 600 нм (рис. 1в). Также следует отметить, что при работе с аргоновой плазмой нельзя исключать формирование молекул озона, вызывающего сильное окислительное действие. Негативное влияние аргоновой плазмы на численность клеток можно объяснить тем, что радикалы молекулярного азота могут быть токсичны для живых организмов, а NO является медиатором, который воздействуя на рецепторы, расположенные на мембране *Paramecium caudatum* способен вызывать адгезивное состояние у клеток и усиливать их агрегацию [5, 6].

В эксперименте с применением гелиевой плазмы при регистрации свечения струи помимо линий возбужденного гелия и радикалов N_2 , NO и OH, были зарегистрированы также линии свечения O_2 и его активных форм (в частности O_3 и O_2^+) в спектральном диапазоне от 700 до 900 нм (рис. 1г). Возбужденные формы кислорода, по-видимому, образуются в результате вторичных процессов пе-

редачи энергии от возбужденных состояний атомов гелия. Кислород в активном состоянии может приводить к серьезному окислительному стрессу внутри клеток *Paramecium caudatum*, вследствие чего нарушаются процессы окислительного фосфорилирования; работа митохондрий, которые отвечают за синтез АТФ внутри эукариотических клеток. Такое воздействие приводит к гибели клеток, а также вызывает длительные, необратимые реакции у выживших организмов, которые затрудняют и замедляют процесс пролиферации и деления. Сравнив результаты действия аргоновой и гелиевой плазмы, в нашем эксперименте отмечаются два совершенно разных свободно-радикальных процесса: влияние на клетки N_2 , NO и OH в случае применения для аргоновой, и действие O_2 и его активных форм, содержащихся в гелиевой плазме. Кроме того, были проведены опыты по определению pH жидкости после воздействия плазмой. Отмечено, что в случае воздействия как гелиевой, так и аргоновой плазмы, происходит значительное, по сравнению с контролем, снижение уровня pH (закисление среды) за счет образования уже упомянутых свободных радикалов и активных форм кислорода.

Анализируя действие препарата на клетки *Paramecium caudatum* (рис. 2в), было зарегистрировано, что как испытуемая, так и контрольная группа теряли в среднем около 20% общей численности особей за 120 ч наблюдения. Это связано с тем, что для всех инфузорий *Paramecium caudatum*, участвующих в эксперименте, ввели ограничение на питание, чтобы исключить бесконтрольное размножение, которое бы повлияло на чистоту эксперимента. Также содержание исследуемых организмов проводилось в определенных условиях, позволяющих избежать испарения жидкости в пробках, и одновременно возникновения гипоксии для клеток. Однако, такие требования к содержанию опытных клеток оказывали определенное отрицательное воздействие на их пищевое поведение.

Мексидол, как известно, является сильным антиоксидантом [8]. При добавлении в среду мексидола клетки сохраняют свою численность до второго дня регистрации включительно. Это обусловлено выведением скопившихся метаболитов и продуктов жизнедеятельности клеток и регуляцией внутриклеточных процессов, связанных с митохондриальной активностью. Однако по истечению эксперимента количество клеток в этой группе относительно сравнялось с количеством клеток в контрольной группе, так как все еще действовал фактор отсутствия пищевого ресурса. При воздействии как аргоновой, так и гелиевой низкотемпературной плазмой на *Paramecium caudatum* в присутствии мексидола в среде отмечается полное нивелирование негативного влияния окислительного стресса на клетки (рис. 2г). Это свиде-

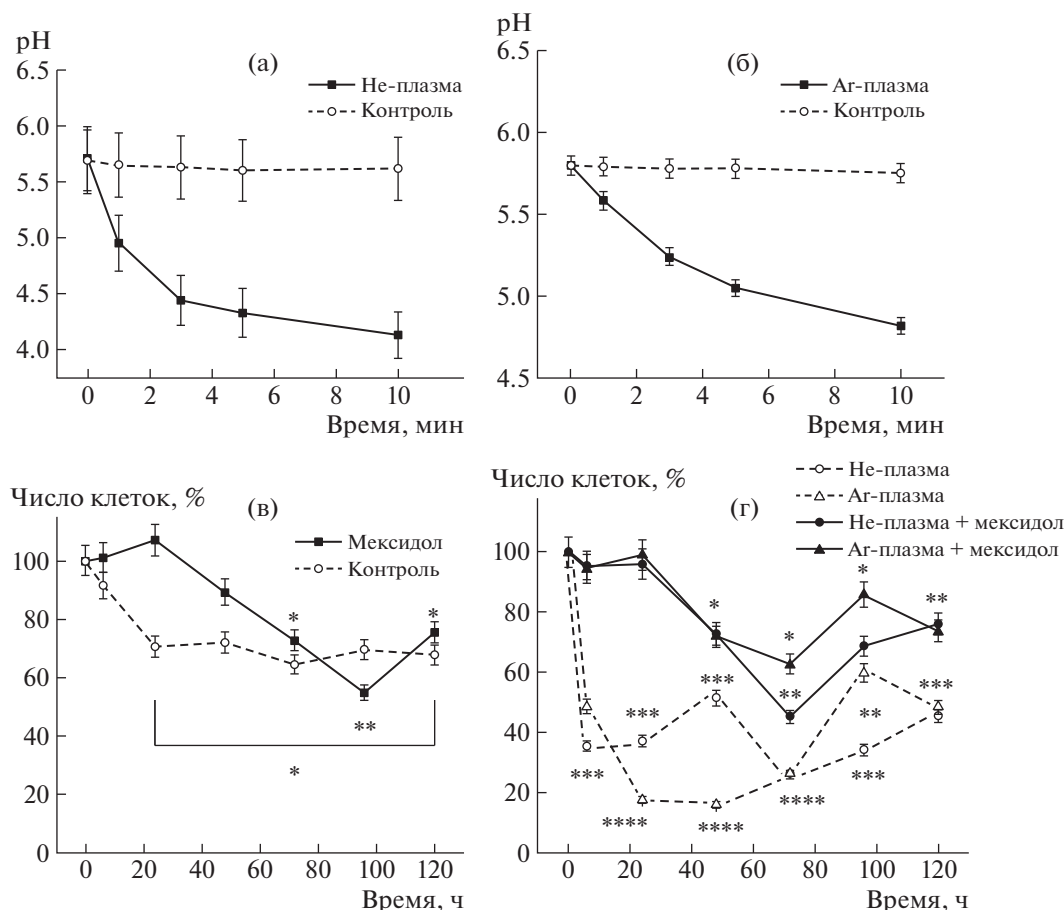


Рис. 2. Данные по изменению уровня кислотности среды и числа клеток после воздействия низкотемпературной плазмой и/или добавления мексидола: (а) изменение pH-уровня среды от времени воздействия гелиевой плазмы; (б) изменение pH-уровня среды от времени воздействия аргоновой плазмы; (в) изменение числа клеток от времени при добавлении мексидола и без него; (г) изменения числа клеток от времени после воздействия холодной плазмы при добавлении мексидола и без него.

тelleствует о том, что мексидол проявляет сильные антиоксидантные свойства, которые достаточно продолжительное время (в течение трех дней) поддерживают оптимальные условия среды, а в долгосрочной перспективе количество особей выходит на уровень контрольных значений. Кроме того, были проведены контрольные эксперименты для исключения сценария, в котором мексидол, как сильный антиоксидант, просто стабилизирует условия среды, в частности pH, тем самым защищая клетки от окислительного стресса. Полученные результаты позволяют с утверждать, что препарат действует преимущественно на внутриклеточном уровне, не изменяя непосредственно уровень кислотности среды. Из сравнения действия препаратов на клетки видно, что максимальные эффект мексидола проявляется в “острой” фазе воздействия низкотемпературной плазмы, а именно, в первый день после воздействия (см. рис. 2г).

Морфологический анализ культуры клеток *Paramecium caudatum* после воздействия низкотемпературной плазмы позволил выявить заметные различия (рис. 3).

После воздействия аргоновой низкотемпературной плазмой на культуру клеток *Paramecium caudatum* наблюдался эффект слипания особей с последующим нарушением пищевого и двигательного поведения (рис. 3а). Иная картина наблюдается при окислительном стрессе, вызванном действием гелиевой низкотемпературной плазмы (рис. 3б). В этом случае нами зарегистрировано, что большая часть клеток находится в лизированном состоянии с большим количеством внутриклеточной жидкости, попавшей в окружающую среду. При добавлении в среду мексидола за 1 мин до воздействия плазмой (рис. 3в, 3г) установлено, что препарат корректирует негативные последствия как аргоновой, так и гелиевой низкотемпературной плазмы, сохраняя внешнее и

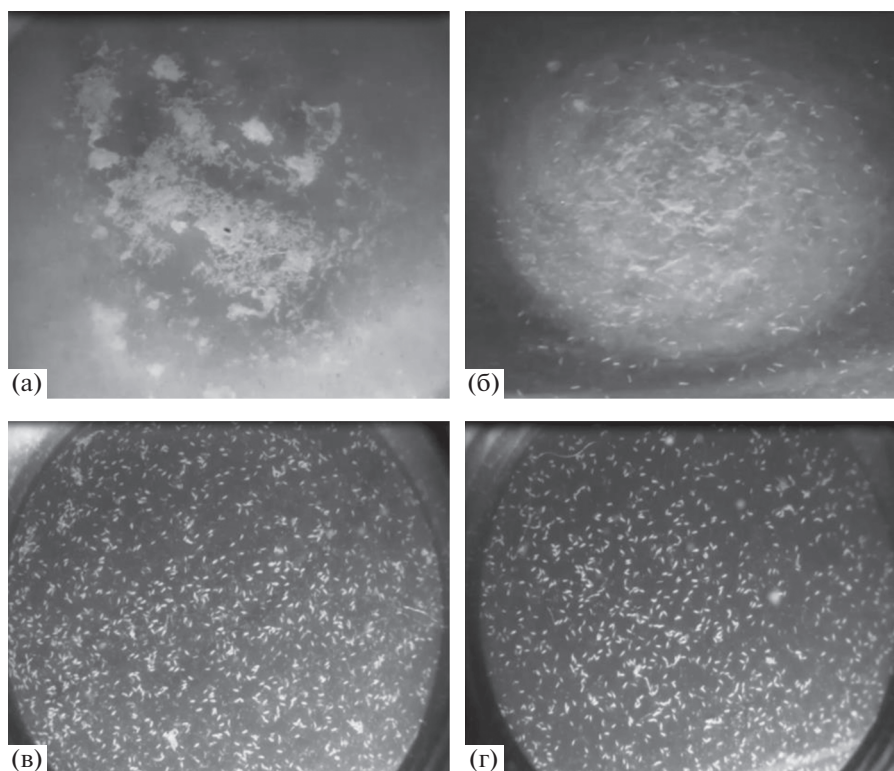


Рис. 3. Фотографические изображения клеток *Paramecium caudatum* после действия низкотемпературной плазмы аргона и гелия (время регистрации — 4 ч после воздействия): (а) адгезия клеток *Paramecium caudatum* после воздействия аргоновой плазмы; (б) лизис клеток *Paramecium caudatum* после воздействия гелиевой плазмы; (в) протекторное действие мексидола при окислительном стрессе, вызванном низкотемпературной плазмой аргона; (г) протекторное действие мексидола при окислительном стрессе, вызванном низкотемпературной плазмой гелия.

внутреннее строение клеток *Paramecium caudatum* в неизменном виде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение низкотемпературной плазмы показало свою эффективность для изучения антиоксидантных свойств фармакологических препаратов. В установленных условиях данного эксперимента с применением низкотемпературной плазмы атмосферного давления была определена высокая антиоксидантная активность мексидола. Максимальный эффект протекторных свойств препарата проявляется в “острой фазе”, позволяя клеткам сохранять свою численность почти на 100% уровне от изначального.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Brette R. // eNeuro. 2021. V. 8. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0018-21.2021>
2. Gruzdev G.A., Karpukhina O.V., Yakunin V.G., Inozemtsev A.N., Savinov V.P., Timoshenko V.Yu., Kamensky A.A. // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2021. V. 764 (76). P. 244–248. <https://doi.org/10.3103/S0096392521040027>
3. Morgunov I.G., Karpukhina O.V., Kamzolova S.V., Samoilenko V.A., Inozemtsev A.N. // Prep. Biochem. Biotechnol. 2018. V. 48. P. 1–5. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1381622>
4. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. // Nat. Methods. 2021. V. 9. P. 676–682. <https://www.nature.com/articles/nmeth.2019>
5. Karami M., Shahrokhi S.S., Kazemi B., Moezzi S.S. // Iran J. Microbiol. 2013. V. 5. P. 91.
6. Bancirova M. // Luminescence. 2017. V. 32. P. 1294–1298. <https://doi.org/10.1002/BIO.3324>
7. Martynov M.Y., Zhuravleva M.V., Vasyukova N.S., Kuznetsova E.V., Kameneva T.R. // Zh. Nevrol. Psikhiatr. Korsakova. 2023. V. 123. P. 16–27. <https://doi.org/10.17116/JNEURO202312301116>

Effect of Cold Atmospheric Pressure Gas-Discharge Plasma on Cellular Model of *Paramecium Caudatum* in the Study of the Antioxidant Properties of Mexidol

G. N. Abrashitov^{1, *}, G. A. Gruzdev¹, V. G. Yakunin²,
V. P. Savinov², O. V. Karpukhina^{1, 3}, and V. Yu. Timoshenko^{2, 4}

¹Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

³Semenov Federal Research Centre of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

⁴National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, 115409 Russia

*e-mail: gleb58a@mail.ru

Received May 30, 2023; revised June 6, 2023; accepted June 12, 2023

Abstract—The cytoprotective properties of mexidol were studied under the influence of argon and helium gas-discharge cold plasma of atmospheric pressure on *Paramecium caudatum* cell culture. It has been shown that mexidol exhibits strong antioxidant properties and practically completely eliminates the negative effects of oxidative stress, retaining almost 100% of the initial number of cells. The data obtained demonstrate a wide range of behavioral responses of *Paramecium caudatum*, which confirms their practical value as model objects for pharmacological and toxicological studies and the use of gas-discharge cold plasma makes it possible to exclude the direct oxidative effect of hydrogen peroxide (the standard model of oxidative stress) on the studied drugs and to increase the reliability of toxicological studies.

Keywords: *paramecium caudatum*, mexidol, cytoprotection, gas discharge, cold plasma