

ОЦЕНКА МЕХАНИЗМОВ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИЗЛУЧЕНИЯ ГАЗОРАЗРЯДНОЙ ПЛАЗМЫ

УДК 576.5:536.087:61.001.6–006.6

Поступила 10.10.2013 г.



И.П. Иванова, д.б.н., зав. научной проблемной лабораторией физико-химических исследований НИИ ПФМ¹;

С.В. Трофимова, младший научный сотрудник научной проблемной лаборатории физико-химических исследований НИИ ПФМ¹;

М.В. Ведунова, к.б.н., старший научный сотрудник научной проблемной группы клеточных технологий НИИ ПФМ¹;

А.С. Жаберева, к.б.н., старший научный сотрудник научной проблемной группы постгеномных технологий НИИ ПФМ¹;

М.Л. Бугрова, к.б.н., зав. отделом электронной микроскопии НИИ ПФМ¹;

И.М. Пискарев, к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник²;

Н. Карпель Вель Лейтнер, д.х.н., старший научный сотрудник лаборатории химии и микробиологии воды³

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603000, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²НИИ ядерной физики имени Д.В. Скобельцына Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, 119992, Ленинские горы;

³Poitiers University, Poitiers, France, 86022, Recteur Pineau Avenue, 40

Цель исследования — оценка механизмов цитотоксического действия излучения газоразрядной плазмы в отношении опухолевых клеток лимфосаркомы и рака молочной железы.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на штаммах опухолевых клеток лимфосаркомы (LSR) и рака молочной железы крыс (RMK1). Суспензии клеток объемом 4 мл и концентрацией $(4-6) \cdot 10^6$ /мл обрабатывали излучением газоразрядной плазмы в различных временных режимах. Генерирование излучения плазмы проводили импульсным устройством, имеющим следующие заданные характеристики: длительность одного импульса — 100 мкс, напряжение — 11 кВ, энергия в одном импульсе — $5,9 \cdot 10^{-2}$ Дж, частота импульсов — 10 Гц. Цитотоксическое действие излучения газоразрядной плазмы оценивали с использованием флуоресцентных красителей Hoechst (Sigma ALDRICH, США), Propidium iodide (Sigma ALDRICH, США) и МТТ-теста. Структурные изменения в клетках изучали методом электронной микроскопии. Состояние цитоплазматической мембраны оценивали по изменению микровязкости с использованием гидрофобного флуоресцентного зонда пирена (Sigma ALDRICH, США). Уровень окислительных процессов определяли по флуоресценции битиросина, триптофана, гликозилированных белков и процессам перекисного окисления липидов. О состоянии коферментов судили по флуоресценции НАД(Ф)⁺/НАД(Ф)Н⁺ и ФАД⁺/ФАДН₂. Степень повреждения ДНК клеток оценивали методом ДНК-комет.

Результаты. Установлено, что воздействие на клетки LSR и RMK1 излучением плазмы в течение 600 с является полулетальной дозой. Оно вызывает значительные нарушения в структуре цитоплазматической и ядерной мембран, внутриклеточном содержимом, снижает показатели микровязкости как в липидном бислое, так и в зоне белок-липидных взаимодействий клеток LSR и RMK1. Белковые молекулы этих клеток под действием излучения газоразрядной плазмы претерпевают выраженную окислительную модификацию. Накопления продуктов перекисного окисления липидов не зарегистрировано. Под действием излучения плазмы для изученных типов клеток происходит также увеличение содержания восстановленной формы НАД(Ф)Н⁺ и окисленной формы ФАД⁺. Количество клеток со значительным повреждением ДНК вырастает до 81% к 600-й секунде обработки. Все изменения находятся в прямой зависимости от продолжительности времени воздействия.

Ключевые слова: цитотоксическое действие; излучение газоразрядной плазмы; опухолевые клетки LSR и RMK1.

Для контактов: Иванова Ирина Павловна, тел. раб. 8(831)465-42-81, тел. моб. +7 920-059-40-28; e-mail: ivanova.ip@mail.ru

English

Assessment of Cytotoxic Effect Mechanisms of Gas-Discharge Plasma Radiation

I.P. Ivanova, D.Bio.Sc., Head of the Laboratory of Physicochemical Researches, Scientific Research Institute of Applied Fundamental Medicine¹;

S.V. Trofimova, Junior Research Worker, Laboratory of Physicochemical Researches, Scientific Research Institute of Applied Fundamental Medicine¹;

M.V. Vedunova, PhD, Senior Research Worker, Problem Scientific Group of Cellular Technologies, Scientific Research Institute of Applied Fundamental Medicine¹;

A.S. Zhabereva, PhD, Senior Research Worker, Problem Scientific Group of Post-Genomic Technologies, Scientific Research Institute of Applied Fundamental Medicine¹;

M.L. Bugrova, PhD, Head of Electron Microscopy Units, Scientific Research Institute of Applied Fundamental Medicine¹;

I.M. Piskaryov, PhD, Leading Research Worker²;

N. Karpel Vel Leitner, D.Chem.Sc., Senior Research Worker, Laboratory of Chemistry and Microbiology of Water³

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603000;

²Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics of Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, Moscow, Russian Federation, 119992;

³Poitiers University, Recteur Pineau Avenue, 40, Poitiers, France, 86022

The aim of the investigation was to assess the mechanisms of cytotoxic effect of gas-discharge plasma radiation on lymphosarcoma and breast cancer cells.

Materials and Methods. The experiment was carried out on the strains of rat lymphosarcoma (LSR) and breast cancer (RMK1) cells. 4 ml of cell suspension at 4–6·10⁶/ml concentration was exposed to gas-discharge plasma radiation in various time modes. Plasma radiation was generated by impulse device with the following set characteristics: burst time — 100 μs, voltage — 11 kV, energy per pulse — 5.9·10⁻² J, pulse frequency — 10 Hz. Cytotoxic effect of gas-discharge radiation was assessed using fluorescent dye Hoechst (Sigma ALDRICH, USA), Propidium iodide (Sigma ALDRICH, USA) and MTT-test. Structural changes in cells were studied by electron microscopy. Cytoplasmic membrane condition was assessed by microviscosity change using a hydrophobic fluorescent probe pyrene (Sigma ALDRICH, USA). The level of oxidative processes was determined by fluorescence of bityrosine, tryptophan, glycated proteins and lipid peroxidation processes. The state of coenzymes was estimated by NAD(P)⁺/NAD(P)H+H⁺ and FAD⁺/FADH₂. DNA cell damage degree was assessed by DNA-comet assay.

Results. 600-second radiation exposed to LSR and RMK1 cells was found to be a half-lethal dose. Such radiation causes significant changes in the structure of cytoplasmic and nuclear membranes, intracellular content, reduces microviscosity indices both in a lipid bilayer and in protein-lipid interaction area of LSR and RMK1 cells. Protein molecules of these cells undergo marked oxidative modification exposed to gas-discharge plasma radiation. No accumulation of lipid peroxidation products was recorded. The content of reduced NAD(P)H+H⁺ and oxidized FAD⁺ increases in the cells under study under plasma radiation. The number of cells with significantly damaged DNA increases up to 81% by 600th second of exposure. All changes were in direct relationship to time exposure duration.

Key words: cytotoxic effect; gas-discharge plasma radiation; LSR and RMK1 tumor cells.

Плазменные технологии в биологии и медицине являются динамически развивающимся направлением, медико-биологические эффекты плазмы активно исследуются учеными разных стран. Разработка плазменных устройств, генерирующих фармакологические дозы активных частиц, и стандартизация плазменных технологий могут решить многие проблемы и открывают новые горизонты как в физиологических и биохимических исследованиях, так и в разработке новых методов лечения.

К настоящему моменту опубликовано большое количество работ с указанием на биологические эффекты плазмы, такие как бактерицидное, спорацидное, цитотоксическое действия, регенерация [1–3]. В связи с открытием проапоптотической активности плазмы учеными активно исследуется возможность использования плазменных технологий в качестве противоопухолевой

терапии [4–6]. Однако о механизмах цитотоксического действия плазмы известно гораздо меньше, а данные, полученные в многочисленных научных лабораториях, оказываются довольно противоречивыми в отношении вклада различных факторов плазмы (ионы, радикалы, электромагнитные поля, излучение плазмы) в бактерицидный и цитотоксический эффекты, что обуславливает актуальность исследований в этом направлении.

Излучение является основным действующим фактором плазмы искрового разряда. К настоящему времени уже детектированы некоторые активные частицы излучения плазмы, образующиеся в газовой фазе и жидкости, установлены бактерицидный, спорацидный и цитостатический эффекты излучения плазмы, изучаются структурно-функциональные изменения прокариотических клеток [7–9]. Однако комплексного исследования структурно-функционального состояния

эукариотических клеток после воздействия излучением плазмы искрового разряда до настоящего момента не проводилось.

Цель исследования — оценка механизмов цитотоксического действия излучения газоразрядной плазмы в отношении опухолевых клеток лимфосаркомы и рака молочной железы.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на штаммах опухолевых клеток лимфосаркомы (LSR) и рака молочной железы крыс (RMK1). Штамм LSR взят от беспородной крысы, получавшей 3,3-дихлорбензидин, опухоль состоит из лимфоидных клеток различной величины. Штамм RMK1 получен из протоков молочной железы самок белых беспородных крыс (рак возник спонтанно) и представлен альвеолярными структурами и атипичными эпителиальными клетками. Штаммы приобретены в РОНЦ им. Н.Н. Блохина (Москва).

Генерирование излучения плазмы искрового разряда проводили импульсным устройством «Пилимин», имеющим следующие характеристики: длительность одного импульса — 100 мкс, напряжение — 11 кВ, энергия в одном импульсе — $5,9 \cdot 10^{-2}$ Дж, частота импульсов — 10 Гц. Устройство разработано И.М. Пискаревым, ведущим научным сотрудником Института ядерной физики им. Д.В. Скобельцына МГУ им. М.В. Ломоносова в 2011 г.

Для анализа клетки ресуспендировали в растворе Хенкса («Биолот», Россия) до концентрации $(4-6) \cdot 10^6$ /мл. Суспензии клеток объемом 4 мл обрабатывали излучением низкотемпературной газоразрядной плазмы в различных временных режимах от 30 до 1800 с.

Для оценки цитотоксического действия излучения газоразрядной плазмы были использованы флуоресцентные красители Hoechst (Sigma ALDRICH, США), Propidium iodide (Sigma ALDRICH, США) и МТТ-тест [10, 11]. Измерения проводили на флуоресцентном микроскопе Leica DMIL HC (Leica Microsystems, Германия) и спектрофлуориметре «Флюорат-02 Панорама» («Люмэкс», Россия).

Структурные изменения в клетках изучали с использованием электронной микроскопии [12]. Электронные фотографии получали на электронно-трансмиссионном микроскопе Morgagni 268D (FEI, США). Видеокамера Mega View (Arecont Vision, США) транслировала изображение на экран компьютера. С изображениями работали в программе анализа AnalySIS.

Состояние цитоплазматической мембраны клеток оценивали по изменению микровязкости с использованием гидрофобного флуоресцентного зонда пирена (Sigma ALDRICH, США) [13]. Измерения проводили на спектрофлуориметре «Флюорат-02 Панорама» («Люмэкс», Россия).

Экстракцию липидов из анализируемого материала выполняли методом Folch. Уровень общих липидов определяли с помощью набора TOTAL LIPIDS BIO-LACHEMA-TEST (PLIVA-Lachema Diagnostica, Чехия). Интенсивность перекисного окисления липидов оценивали по относительным концентрациям низкомолекулярных неокисленных продуктов, диеновых конъюгатов,

молекул с цис- и транс-конъюгированными двойными связями, триеновых конъюгатов, малонового диальдегида, оснований Шиффа [14–16]. Измерения проводили на спектрофлуориметре «Флюорат-02 Панорама» («Люмэкс», Россия).

Концентрацию общего белка определяли биуретовым методом с помощью набора TOTAL PROTEIN «FL-E» (VITAL DIAGNOSTICS, Россия). Окислительную модификацию белков оценивали по флуоресценции битирозина, продуктов неферментативного гликозилирования белков и остатков триптофана [17–19]. Измерения проводили на спектрофлуориметре «Флюорат-02 Панорама» («Люмэкс», Россия).

О состоянии коферментов судили по флуоресценции НАД(Ф)Н+Н+ и ФАД+ [20, 21]. Измерения проводили на спектрофлуориметре «Флюорат-02 Панорама» («Люмэкс», Россия).

Степень повреждения ДНК клеток исследовали методом ДНК-комет. Для определения доли клеток с разной степенью поврежденности ДНК оценивали распределение их по группам в зависимости от значения показателя «процент ДНК в хвосте кометы»: от 0 до 5%; от 5,1 до 10%; от 10,1 до 15%; от 15,1 до 20%; более 20% [22]. Гель-слайды анализировали на флуоресцентном микроскопе Leica DMIL HC (Leica Microsystems, Германия).

Полученные в экспериментальных исследованиях значения обрабатывали с помощью прикладных стандартных пакетов программ Excel и Statistica v.6.0.

Результаты и обсуждение. При оценке цитотоксического действия излучения газоразрядной плазмы в отношении клеток LSR и RMR1 выявлено, что воздействие в течение 600 с является полулетальной дозой (рис. 1).

Далее исследовались структурные изменения в клетках под действием излучения газоразрядной плазмы. Установлено, что клетки LSR контрольной серии (необработанные) имеют округлую форму с неповрежденной цитоплазматической и ядерной мембраной. После воздействия излучением плазмы в клеточном содержимом наблюдалась разреженность. С увеличением продолжительности воздействия нарушалась целостность цитоплазматической и ядерной мембраны, отмечено образование пор (рис. 2).

Клетки RMK1 контрольной серии имели по большей части овоидную форму с крупным ядром, ядерный хроматин представлен мелкозернистой структурой. Ядрышки — крупные. Воздействие излучением плазмы в течение 15 мин вызывало вакуолизацию внутриклеточного содержимого и деформацию ядерной мембраны. После обработки в течение 30 мин отмечались разрывы в ядерной мембране (рис. 3).

Таким образом, излучение плазмы вызывает определенные нарушения в структуре цитоплазматической и ядерной мембран и внутриклеточного содержимого клеток LSR и RMK1. Значительность нарушений находится в прямой зависимости от продолжительности времени воздействия.

При изучении состояния цитоплазматической мембраны клеток установлено, что с увеличением продол-

Рис. 1. Число нежизнеспособных (а) и жизнеспособных (б) клеток LSR и RMK1 после обработки излучением плазмы; * — статистически значимое различие значений относительно необработанной серии, $p < 0,05$

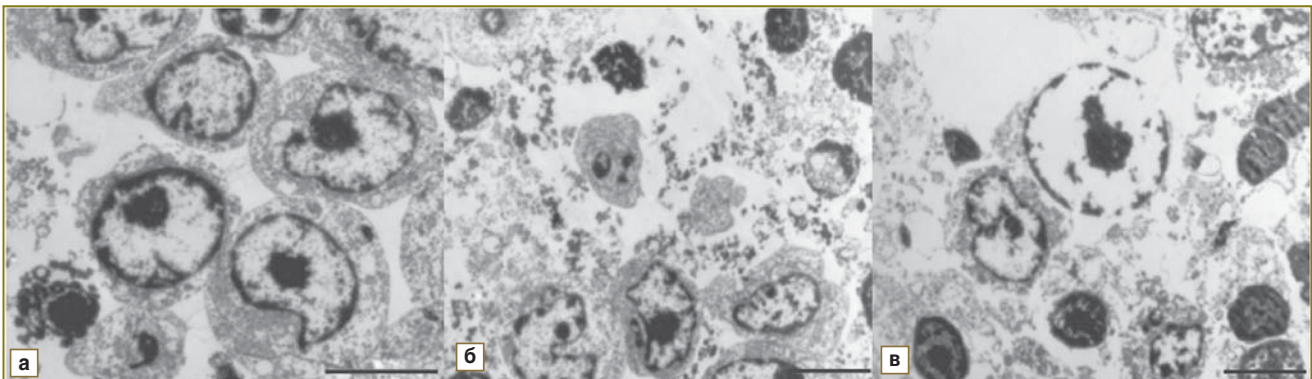
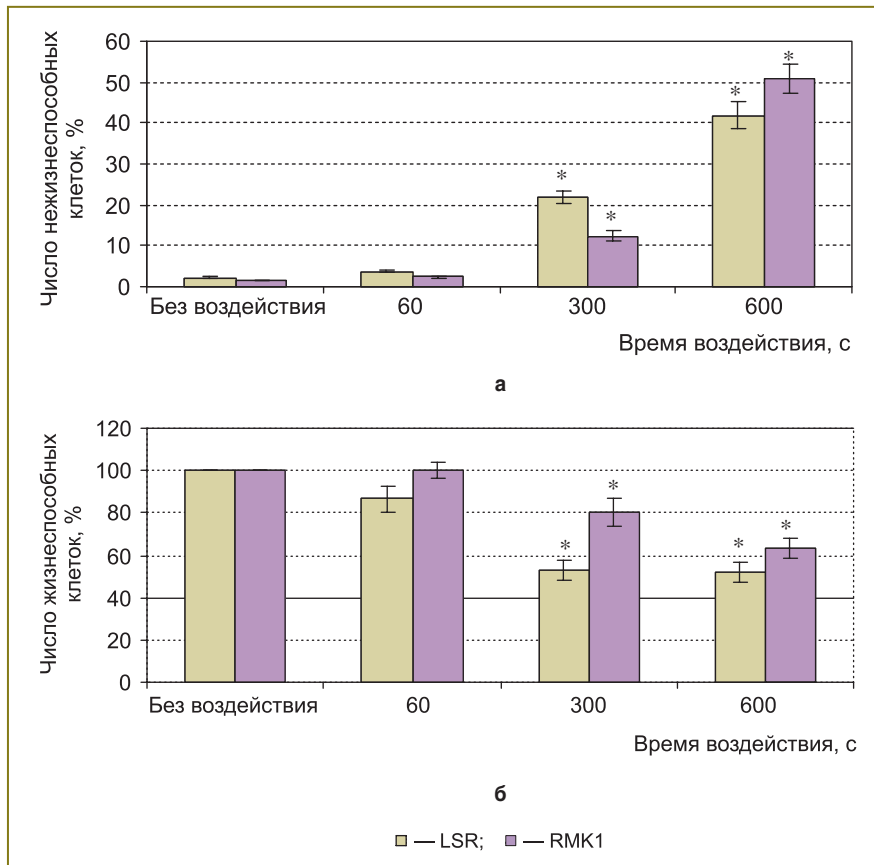


Рис. 2. Электронные фотографии клеток LSR после воздействия излучением плазмы искрового разряда: а — контроль; б — обработка в течение 15 мин; в — обработка в течение 30 мин (длина отрезка — 5 мкм)

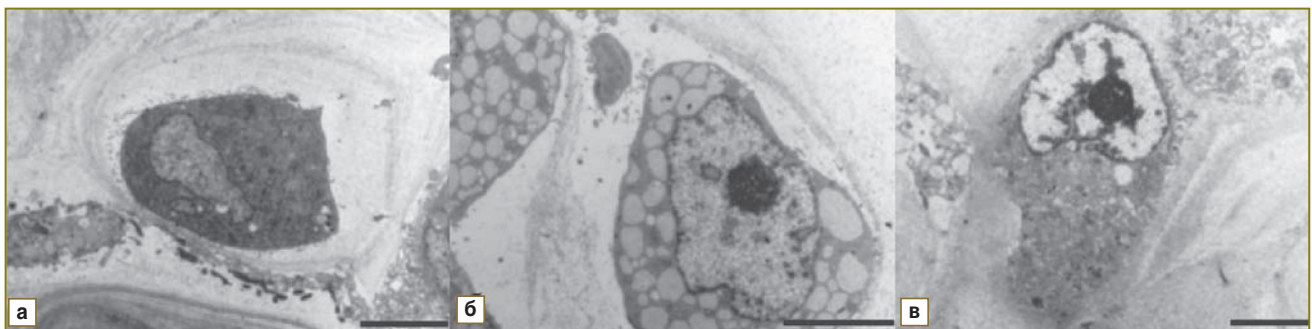


Рис. 3. Электронные фотографии клеток RMK1 после воздействия излучением плазмы искрового разряда: а — контроль; б — обработка в течение 15 мин; в — обработка в течение 30 мин (длина отрезка — 5 мкм)

Таблица 1

Вязкость липидного бислоя и белок–липидных областей мембран лимфоидных и эпителиальных клеток после воздействия излучением плазмы искрового разряда, отн. ед.

Время воздействия, с	Клетки LSR		Клетки RMK1	
	Липидный бислой	Белок–липидная зона	Липидный бислой	Белок–липидная зона
Без воздействия	2,65±0,17	15,92±1,10	3,39±0,09	17,4±0,9
60	2,40±0,18	13,62±1,00	3,10±0,10	16,40±1,37
300	1,98±0,11*	11,92±1,20*	2,62±0,20*	13,20±1,13*
1200	1,68±0,08*	6,22±0,40*	2,02±0,07*	11,70±1,12*

* — статистически значимое различие значений относительно необработанной серии, $p < 0,05$.

жительности облучения снижаются показатели микровязкости: как в липидном бислое — в 1,6–1,7 раза, так и в зоне белок–липидных взаимодействий — в 1,5–2,6 раза (табл. 1). Известно, что изменение микровязкости оказывает существенное влияние на мембраносвязанные процессы (проницаемость для ионов и молекул, участвующих в клеточном метаболизме), на работу мембранных ферментов и рецепторных систем [23], что, безусловно, будет сказываться в том числе и на жизнеспособности клеток.

Микровязкость мембран — это суммарный показатель, который зависит как от состояния белкового компонента, так и от состояния липидных молекул [23]. В связи с этим далее исследовались процессы окисления белков и липидов.

Изучение перекисного окисления липидов в клетках LSR и RMK1 под действием излучения плазмы не выявило изменений относительных концентраций первичных, вторичных и конечных продуктов. Эти результаты согласуются с данными, полученными нами в 2012 и 2013 гг. [9, 24]. В работах показано, что после воздействия излучением плазмы искрового разряда на взвеси липосом из общих липидов клеток, холестерина и триглицеридов относительные концентрации диеновых и триеновых конъюгатов не увеличивались, а интенсивность процессов липопероксидации бактериальных клеток снижалась.

Анализ окислительной модификации белковых молекул показал, что в клетках LSR под действием излучения плазмы к 1200-й секунде обработки уровень битирозина и гликозилированных белков возрастал в 2,4 и 2,3 раза соответственно, содержание триптофана снижалось в 7,6 раза (рис. 4).

В клетках RMK1 возрастание содержания битирозина и гликозилированных белков было менее выражено — на 15 и 43% соответственно, уровень триптофана снижался к 1200-й секунде обработки в 9 раз (см. рис. 4).

Таким образом, белковые молекулы клеток LSR и RMK1 претерпевают выраженную окислительную модификацию под действием излучения газоразрядной плазмы, что, несомненно, будет приводить к нарушению многочисленных функций, выполняемых белковыми комплексами. Одной из важнейших функций белков является ферментативная. Многие ферментативные реакции включают перенос электронов или групп атомов с одного субстрата на другой. В таких реакциях принимают участие коферменты, которые выполняют функцию промежуточных переносчиков атомов или функциональных групп. Известно, что пиридиннуклеотиды — коферменты дегидрогеназ, флавиннуклеотиды — коферменты дегидрогеназ, оксидаз и монооксигеназ [25]. Установлено, что НАД(Ф)Н+ интенсивно флуоресцирует, а НАД(Ф)+ не флуоресцирует, фла-

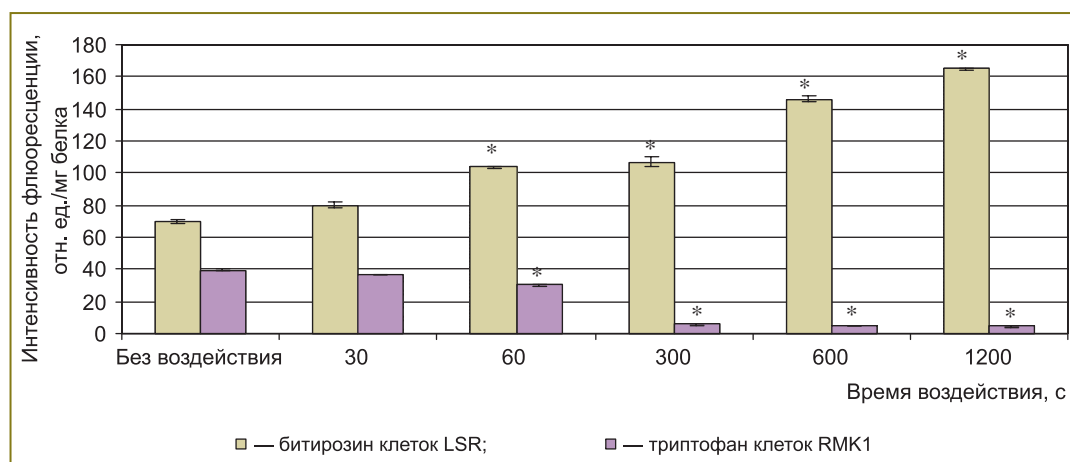


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции триптофана и битирозина опухолевых клеток после обработки излучением плазмы; * — статистически значимое различие значений относительно необработанной серии, $p < 0,05$

винуклеотиды, напротив, очень легко восстанавливаются и после этого теряют способность к флюоресценции [20, 21].

Также известно, что восстановленный НАД(Ф)Н+Н+ необходим для роста, дифференцировки и запрограммированной гибели клеток. Направленность процессов клеточной гибели в сторону апоптоза или некроза в значительной степени зависит от внутриклеточной концентрации НАД+ и АТФ. Снижение уровня НАДН+Н+ и АТФ ведет к индукции некроза [26]. ФАДН₂ является кофактором фермента репликации ДНК-фотолиазы, при участии которого происходит «расшивка» димеров тимина.

Результаты проведенной работы позволяют утверждать, что под действием излучения плазмы искрового разряда происходит увеличение содержания восстановленной формы НАД(Ф)Н+Н+ и окисленной формы ФАД+: для изученных типов клеток — в 1,5–2 и 2–5 раз соответственно (табл. 2). Такие изменения могут быть результатом нарушений в метаболических путях клетки и служить индуктором апоптотических процессов.

К настоящему моменту установлено, что под действием излучения плазмы деградирует нуклеоид прокариотических клеток [9]. Можно предположить, что излучение плазмы способно повреждать и ДНК эукариотических клеток.

Эксперименты показали, что к 600-й секунде обра-

Таблица 2

Уровень НАД(Ф)Н+Н+ и ФАД+ в клетках после обработки излучением плазмы, отн. ед. флюоресценции

Время воздействия, с	Клетки LSR		Клетки RMK1	
	НАД(Ф)Н+Н+	ФАД+	НАД(Ф)Н+Н+	ФАД+
Без воздействия	0,046±0,001	0,0375±0,0025	0,050±0,001	0,08857±0,01
30	0,050±0,0007	0,070±0,018	0,058±0,001	0,09286±0,01
60	0,065±0,001*	0,050±0,005	0,058±0,0003	0,08714±0,0076
300	0,070±0,001*	0,070±0,005*	0,068±0,0045*	0,10±0,001
600	0,080±0,0003*	0,10±0,004*	0,069±0,001*	0,12429±0,0049*
1200	0,098±0,006*	0,1925±0,0075*	0,078±0,006*	0,170±0,0045*

* — статистически значимая разница значений относительно необработанной серии, p<0,05.

ботки количество клеток LSR с более чем 20% ДНК в хвосте комет увеличивается до 81% (рис. 5).

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что излучение плазмы искрового разряда оказывает деструктивное воздействие на молекулы ДНК эукариотических клеток, что согласуется с данными, полученными ранее в работах по оценке бактерицидного и спорацидного действия такого излучения [8, 9].

Так как ранее в наших исследованиях [7] было показано образование нитросоединений, в частности оксида азота, под действием излучения плазмы в жидкости, можно предположить, что именно они принимают важное участие в цитотоксическом действии. Известно, что оксид азота, с одной стороны, способен ингибировать пролиферацию клеток, с другой — индуцировать

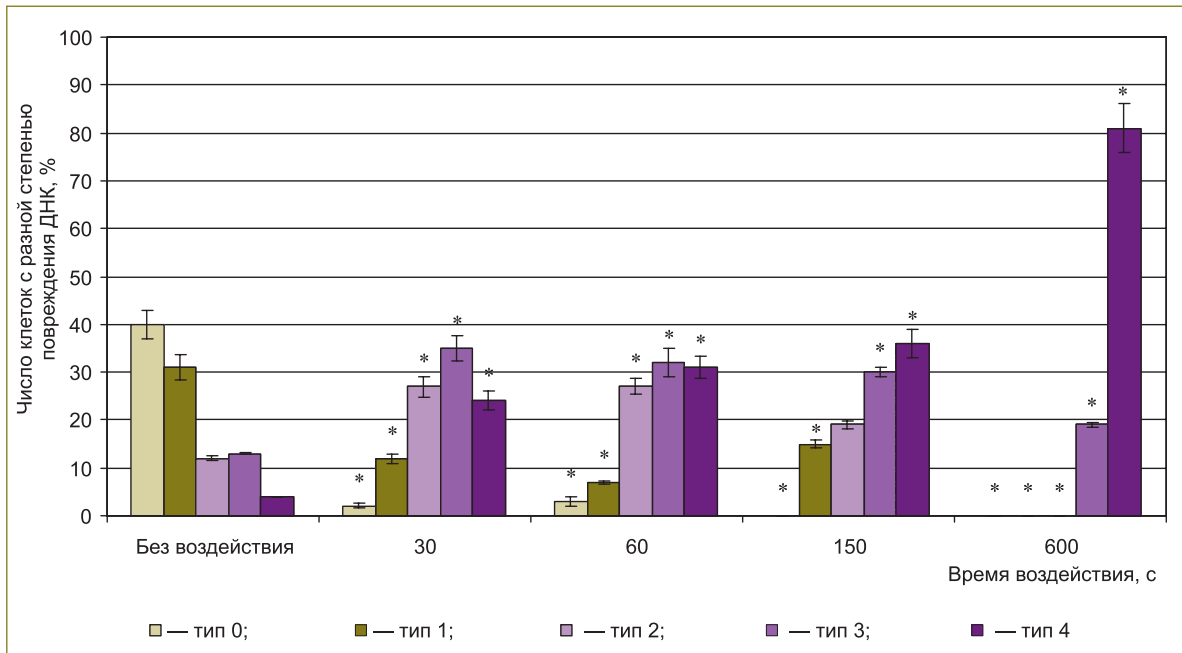


Рис. 5. Процентное соотношение клеток LSR с разной степенью повреждения ДНК после воздействия излучением плазмы: тип 0 — от 0 до 5% ДНК в хвосте; тип 1 — от 5,1 до 10% ДНК в хвосте; тип 2 — от 10,1 до 15% ДНК в хвосте; тип 3 — от 15,1 до 20% ДНК в хвосте; тип 4 — более 20% ДНК в хвосте; * — статистически значимая разница значений относительно необработанной серии, p<0,05

апоптоз [27, 28]. Снижение пролиферативной активности клеток под действием оксида азота может быть обусловлено его способностью инактивировать железосодержащие ферменты, участвующие в процессах синтеза АТФ и репликации молекул ДНК [29]. Также известно, что в процессе свободно-радикальных реакций с участием NO возможно образование мощного оксиданта пероксинитрита, вызывающего ковалентные перестройки в белковых молекулах клетки, повреждения ДНК и, как следствие, активацию апоптоза [30, 31]. Это позволяет заключить, что излучение плазмы искрового разряда оказывает цитотоксическое действие на лимфоидные и эпителиальные опухолевые клетки LSR и RMK1.

Заключение. Излучение газоразрядной плазмы оказывает цитотоксическое действие в отношении опухолевых клеток LSR и RMK1, полунлетальной дозой является обработка их в течение 600 с. Цитотоксическое действие проявляется нарушениями в структуре цитоплазматической и ядерной мембран, во внутриклеточном содержимом, в увеличении текучести цитоплазматической мембраны, в накоплении окислительных модификаций белковых молекул и повреждений ДНК. Все изменения находятся в прямой зависимости от времени воздействия.

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература

1. Kieft I.E., Kurdi M., Stoffels E. Reattachment and apoptosis after plasma-needle treatment of cultures cells. *IEEE Trans Plasma Sci* 2006; 34(4): 1331–1336, <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2006.876511>.
2. Fridman G., Peddinghaus M., Ayan H., Balasubramanian M., Gutsol A., Brooks A.D., Fridman A., Friedman G. Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chem Plasma Process* 2006; 26(4): 425–442, <http://dx.doi.org/10.1007/s11090-006-9024-4>.
3. Laroussi M. Low temperature plasmas for medicine? *IEEE Trans. Plasma Sci* 2009; 37(6): 714–725, <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2009.2017267>.
4. Fridman G., Shereshevsky A., Jost M.M., Brooks A.D., Fridman A., Gutsol A., Vasilets V., Friedman G. Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines. *Plasma Chem Plasma Process* 2007; 27(2): 163–176, <http://dx.doi.org/10.1007/s11090-006-9038-y>.
5. Kim D., Gweon B., Kim D.B., Choe W., Shin J.H. A feasibility study for the cancer therapy using cold plasma. In: 13th International Conference on Biomedical Engineering. Singapore; 2009. P. 355–357, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-92841-6_87.
6. Kim G., Lee H., Shon C. The effect of a micro plasma on melanoma (G361) cancer cells. *Korean Phys Soc* 2009; 54: 628–632.
7. 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. Анализ активных продуктов излучения плазмы искрового разряда, определяющих биологические эффекты в клетках. *Соврем технол мед* 2012; 2: 20–30.
8. Ичеткина А.А., Трофимова С.В., Кряжев Д.В., Иванова И.П., Смирнов В.Ф. Влияние ультрафиолетового излучения и излучения плазмы импульсного искрового разряда на зародышевые структуры и мицелий микромицетов-деструкторов. *Вестник ННГУ им. Н.И. Лобачевского* 2011; 2(2): 196–201.
9. Иванова И.П., Трофимова С.В., Пискарев И.М., Бурхина О.Е.,

Сысоева В.А., Карпель Вель Лейтнер Н. Исследование механизмов биоцидного действия излучения плазмы искрового разряда. *Соврем технол мед* 2012; 3: 12–18.

10. Chery E. Balkman, Tracy L. Gieger, Marsha M. Zgola, Lionel D. Lewis, Margaret C. McEntee. In vitro characterization of Docetaxel as a radiosensitizer in canine and feline cancer cell lines. *Open Journal of Veterinary Medicine* 2012; 2: 285–292, <http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2012.24045>.

11. Zhang H.-T., Luo H., Wu J., Lan L.-B., Fan D.-H., Zhu K.-D., Chen X.-Y., Wen M., Liu H.-M. Galangin induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via the mitochondrial pathway. *World J Gastroenterol* 2010; 16(27): 3377–3384, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v16.i27.3377>.

12. Сапожников А.Г., Доросевич А.Е. Гистологическая и микроскопическая техника. Смоленск: СМУ; 2000; 476 с.

13. Луценко М.Т., Ишутина Н.А. Способ оценки микровязкости мембран эритроцитов путем вычисления коэффициента оксимеризации пирена $K_{экс}$ у беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции в третьем триместре гестации, с учетом определения процентного содержания олеиновой кислоты в мембранах эритроцитов. Патент РФ №2467334. МПК G01N33/53. 2012.

14. Дерюгина А.В., Корягин А.С., Копылова С.В., Таламанова М.Н. Методы изучения стрессовых и адаптационных реакций организма по показателям системы крови. Н. Новгород: Издательство Нижегородского госуниверситета; 2010; 25 с.

15. Wheatley R.A. Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trends in analytical chemistry* 2000; 19: 617–628.

16. Ivanova I.P., Piskarev I.M., Trofimova S.V. Initial stage of lipid peroxidation with HO₂ radicals. Kinetic study. *American Journal of Physical Chemistry* 2013; 2(2): 44–51, <http://dx.doi.org/10.11648/j.ajpc.20130202.13>.

17. Zhang X., Dudek E.J., Liu B., Ding L., Fernandes A.F., Liang J.J., Horwitz J., Taylor A., Shang F. Degradation of C-terminal Truncated α -Crystallins by the ubiquitin-proteasome pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 4200–4208, <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.07-0196>.

18. Дубинина Е.Е., Гавровская С.В., Кузьмич Е.В. и др. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование в очищенных белках с использованием системы Фентона. *Биохимия* 2002; 67: 413–421.

19. Muthenna P., Akileshwari C., Saraswat M., Reddy G.B. Inhibition of advanced glycation end-product formation on eye lens protein by rutin. 2012 Apr; 107(7): 941–949, <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114511004077>. Epub 2011 Aug 25.

20. Farabegoli G., Hellinga C., Heijnen J.J., van Loosdrecht M.C. Study on the use of NADH fluorescence measurements for monitoring waste water treatment systems. *Water Res* 2003 Jun; 37(11): 2732–2738.

21. Жердева В.В., Савицкий А.П. Применение лантанидного индуктивно-резонансного переноса энергии при изучении биологических процессов in vitro и in vivo. *Успехи биологической химии* 2012; 52: 315–362.

22. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Сиднева Е.С., Никитина В.А., Оганесянц Л.А., Середенин С.Б., Бекиш В.Я., Чернуха И.М. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. М; 2006; 28 с.

23. Болдырев А.А., Кяйвярайнен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология. Петрозаводск: Кар НЦ РАН; 2006; 226 с.

24. Иванова И.П., Трофимова С.В., Пискарев И.М. Влияние излучения плазмы искрового разряда на модификацию белков и липидов. *Фундаментальные исследования* 2013; 1(3): 572–575.

25. Северин Е.С. Биохимия. М: ГЭОТАР-МЕД; 2004; 779 с.

26. Xia W., Wang Z., Wang Q., Han J., Zhao C., Hong Y., Zeng L., Tang L., Ying W. Roles of NAD⁺ / NADH and NADP⁺ / NADPH in cell death. *Current Pharmaceutical Design* 2009; 15(1): 12–19, <http://dx.doi.org/10.2174/138161209787185832>.

27. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO синтазы при различных функциональных состояниях. *Биохимия* 2000; 65(4): 485–503.

28. Choi B.-M., Pae H.-O., Jang S. I. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2002; 35(1): 116–126.

29. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях. *Вестник РАМН* 2000; 4: 3–5.

30. Стародубцева М.Н. Пероксинитрит в физиологии и патологии клеток крови. М: Книжный дом «ЛИБРОКОМ»; 2011; 200 с.

31. Kwak J.Y., Han M.K., Choi K.S., Park I.H., Park S.Y., Sohn M.H., et al. Cytokines secreted by lymphokine-activated killer cells induce endogenous nitric oxide synthesis and apoptosis in DLD-1 colon cancer cells. *Cell Immunol* 2000; 203(2): 84–94.

References

1. Kieft I.E., Kurdi M., Stoffels E. Reattachment and apoptosis after plasma-needle treatment of cultures cells. *IEEE Trans Plasma Sci* 2006; 34(4): 1331–1336, <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2006.876511>.

2. Fridman G., Peddinghaus M., Ayan H., Balasubramanian M., Gutsol A., Brooks A.D., Fridman A., Friedman G. Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chem Plasma Process* 2006; 26(4): 425–442, <http://dx.doi.org/10.1007/s11090-006-9024-4>.

3. Laroussi M. Low temperature plasmas for medicine? *IEEE Trans Plasma Sci* 2009; 37(6): 714–725, <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2009.2017267>.

4. Fridman G., Shereshevsky A., Jost M.M., Brooks A.D., Fridman A., Gutsol A., Vasilets V., Friedman G. Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines. *Plasma Chem Plasma Process* 2007; 27(2): 163–176, <http://dx.doi.org/10.1007/s11090-006-9038-y>.

5. Kim D., Gweon B., Kim D. B., Choe W., Shin J.H. A feasibility study for the cancer therapy using cold plasma. In: *13th International Conference on Biomedical Engineering*. Singapore; 2009. P. 355–357, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-92841-6_87.

6. Kim G., Lee H., Shon C. The effect of a micro plasma on melanoma (G361) cancer cells. *Korean Phys Soc* 2009; 54: 628–632.

7. Ivanova I.P., Trofimova S.V., Karpel Vel Leitner N., Aristova N.A., Arkhipova E.V., Burkhina O.E., Sysoeva V.A., Piskaryov I.M. Analiz aktivnykh produktov izlucheniya plazmy iskrovogo razryada, opredelyayushchikh biologicheskie efekty v kletkakh [The analysis of active products of spark discharge plasma radiation determining biological effects in tissues]. *Sovrem Tehnol Med — Modern Technologies in Medicine* 2012; 2: 20–30.

8. Ichetkina A.A., Trofimova S.V., Kryazhev D.V., Ivanova I.P., Smirnov V.F. Vliyanie ul'traioletovogo izlucheniya i izlucheniya plazmy impul'snogo iskrovogo razryada na zarodyshevye struktury i mitseliy mikromitsetov-destruktorov [The effect of ultraviolet radiation and pulse spark discharge plasma radiation on embryonal structures and mycelium of micromycetes-destructors]. *Vestnik Nizhegorodskogo gosudarstvennogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo — Vestnik of Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky* 2011; 2(2): 196–201.

9. Ivanova I.P., Trofimova S.V., Piskaryov I.M., Burkhina O.E., Sysoeva V.A., Karpel Vel Leitner N. Issledovanie mekhanizmov biotsidnogo deystviya izlucheniya plazmy iskrovogo razryada [The study of biocidal mechanisms of spark discharge plasma radiation]. *Sovrem Tehnol Med — Modern Technologies in Medicine* 2012; 3: 12–18.

10. Chery E. Balkman, Tracy L. Gieger, Marsha M. Zgola, Lionel D. Lewis, Margaret C. McEntee. In vitro characterization of Docetaxel as a radiosensitizer in canine and feline cancer cell lines. *Open Journal of Veterinary Medicine* 2012; 2: 285–292, <http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2012.24045>.

11. Zhang H.-T., Luo H., Wu J., Lan L.-B., Fan D.-H., Zhu K.-D., Chen X.-Y., Wen M., Liu H.-M. Galangin induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via the mitochondrial pathway. *World J Gastroenterol* 2010; 16(27): 3377–3384, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v16.i27.3377>.

12. Sapozhnikov A.G., Dorosevich A.E. *Gistologicheskaya i mikroskopicheskaya tekhnika* [Histological and microscopical equipment]. Smolensk: SAU; 2000; 476 p.

13. Lutsenko M.T., Ishutina N.A. *Sposob otsenki mikrovyazkosti membran eritrotsitov putem vychisleniya koeffitsienta eksimerizatsii pirena K_{eks} u beremennykh, perenessikh obstrenie herpes-virusnoy infektsii v tret'em trimestre gestatsii, s uchedom opredeleniya protsentnogo sodержaniya oleinoy kisloty v membranakh eritrotsitov* [The assessment method of red blood cell membrane microviscosity by calculating pyrene excimerization coefficient C_{exc} in pregnant women with recurrent herpes virus infection in the third trimester of gestation based on percentage test of oleic acid in red blood cell membranes]. Patent RF №2467334. МПК G01N33/53. 2012.

14. Deryugina A.V., Koryagin A.S., Kopylova S.V., Talamanova M.N. *Metody izucheniya stressovykh i adaptatsionnykh reaktivnykh organizma po pokazatelyam sistemy krovi* [The methods to study stress and adaptive responses of the body by blood system indices]. Nizhny Novgorod: Izdatel'stvo Nizhegorodskogo gosuniversiteta; 2010; 25 p.

15. Wheatley R.A. Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trends in Analytical Chemistry* 2000; 19: 617–628.

16. Ivanova I.P., Piskarev I.M., Trofimova S.V. Initial stage of lipid peroxidation with HO₂ radicals. Kinetic study. *American Journal of Physical Chemistry* 2013; 2(2): 44–51. 10.11648/j.ajpc.20130202.13.

17. Zhang X., Dudek E.J., Liu B., Ding L., Fernandes A.F., Liang J.J., Horwitz J., Taylor A., Shang F. Degradation of C-terminal Truncated αA-crystallins by the ubiquitin-proteasome pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 4200–4208, <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.07-0196>.

18. Dubinina E.E., Gavrovskaya S.V., Kuz'mich E.V., et al. Okislitel'naya modifikatsiya belkov: okislenie triptofana i obrazovanie v ochishchennykh belkakh s ispol'zovaniem sistemy Fentona [Oxidative protein modification: tryptophan oxidation and formation in purified proteins using Fenton reaction]. *Biokhimiya — Biochemistry* 2002; 67: 413–421.

19. Muthenna P., Akileshwari C., Saraswat M., Reddy G.B. Inhibition of advanced glycation end-product formation on eye lens protein by rutin. 2012 Apr; 107(7): 941–949. Epub 2011 Aug 25, <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114511004077>.

20. Farabegoli G., Hellinga C., Heijnen J.J., van Loosdrecht M.C. Study on the use of NADH fluorescence measurements for monitoring waste water treatment systems. *Water Res* 2003 Jun; 37(11): 2732–2738.

21. Zherdeva V.V., Savitskiy A.P. Primenenie lantanidnogo induktivno-rezonansnogo perenosy energii pri izuchenii biologicheskikh protsessov in vitro i in vivo [The use of lanthanide energy transfer by inductive resonance when studying biological processes in vitro and in vivo]. *Uspekhi biologicheskoy khimii — Advance of Biological Chemistry* 2012; 52: 315–362.

22. Durnev A.D., Zhanataev A.K., Anisina E.A., Sidneva E.S., Nikitina V.A., Oganesyants L.A., Seredenin S.B., Bekish V.Ya., Chernukha I.M. *Primenenie metoda shchelochnogo gel'-elektroforeza izolirovannykh kletok dlya otsenki genotoksicheskikh svoystv prirodnykh i sinteticheskikh soedineniy* [The application of the test of alkaline gel-electrophoresis of isolated cells to assess genotoxic properties of natural and synthetic compounds]. Moscow; 2006; 28 p.

23. Boldyrev A.A., Kyayvyaryaynen E.I., Ilyukha V.A. *Biomembranologiya* [Biomembranology]. Petrozavodsk: Kar NTs RAN; 2006; 226 p.

24. Ivanova I.P., Trofimova S.V., Piskaryov I.M., Ichetkina A.A., Burkhina O.E., Sysoeva V.A. Vliyanie izlucheniya plazmy iskrovogo razryada na modifikatsiyu belkov i lipidov [The influence of the spark discharge plasma radiation on protein's and lipid's modification]. *Fundamentalnie issledovaniya — Fundamental Research* 2013; 1(3): 525–575.

25. Severin E.S. *Biokhimiya* [Biochemistry]. Moscow: GEOTAR-MED; 2004; 779 p.

26. Xia W., Wang Z., Wang Q., Han J., Zhao C., Hong Y., Zeng L.,

Tang L., Ying W. Roles of NAD⁺ / NADH and NADP⁺ / NADPH in cell death. *Current Pharmaceutical Design* 2009; 15(1): 12–19, <http://dx.doi.org/10.2174/138161209787185832>.

27. Men'shikova E.B., Zenkov N.K., Reutov V.P. Oksid azota i NO sintazy pri razlichnykh funktsional'nykh sostoyaniyakh [Nitric oxide and NO synthase in different functional conditions]. *Biokhimiya — Biochemistry* 2000; 65(4): 485–503.

28. Choi B.-M., Pae H.-O., Jang S. I. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2002; 35(1): 116–126.

29. Vanin A.F. Oksid azota v biomeditsinskikh issledovaniyakh [Nitric oxide in biomedical researches]. *Vestnik RAMN — Herald of the Academy of Sciences* 2000; 4: 3–5.

30. Starodubtseva M.N. *Peroksinitrit v fiziologii i patologii kletok krovi* [Peroxy-nitrite in physiology and pathology of blood cells]. Moscow: Knizhnyy dom «LIBROKOM»; 2011; 200 p.

31. Kwak J.Y., Han M.K., Choi K.S., Park I.H., Park S.Y., Sohn M.H., et al. Cytokines secreted by lymphokine-activated killer cells induce endogenous nitric oxide synthesis and apoptosis in DLD-1 colon cancer cells. *Cell Immunol* 2000; 203(2): 84–94.