

Низкотемпературная плазма в биомедицине

И. В. Терешко

А. П. Марков

Среди основных причин изменения структуры заболеваемости во всем мире называют сбои в системе регуляции организма.

Это явление связывают с перегрузкой нервно-психической сферы современного человека, его общеадаптационных и иммунных механизмов, вероятно, вследствие изменения ритма жизни и экологического прессинга. Основой гомеостатических процессов, обуславливающих постоянство состава и свойств биологических систем на разных уровнях их организации, является считывание и распространение информационных сигналов. При анализе путей проведения информационного сигнала обнаруживается его этапность. Вынужденно упрощая ситуацию, чтобы такой ценой добиться определенной целостности взгляда, констатируем, что первый этап связан с проникновением и распространением информационного сигнала в организме до клеток конкретного органа, второй – с его прохождением внутрь клетки, где он становится уже регуляторным. Молекулярные механизмы реализации первого этапа до сих пор мало изучены. Однако установлено, что в восприятии и распространении сигнала по трехмерной структуре органа важнейшую роль играет пространственная организация клеточного микроокружения (внеклеточный матрикс) [1, 2]. Под микроокружением клетки понимают множество молекул, обеспечивающих кооперацию клеток, их позиционное расположение в ткани и формообразование. Правда, само соединение молекул не содержит механизма самоуправления, приводящего к формированию и рациональному функционированию органов или организмов, для этого требуется управление извне. Основой для морфогенетических процессов является клеточная адгезия, по сути представляющая собой реакцию клетки на взаимодействие с любыми поверхностями. Что касается второго этапа прохождения информационных сигналов, то показано несколько путей их распространения через системы вторичных мессенджеров. Принято считать, что многие ключевые события клеточного реагирования локализованы на поверхностной мембране клеток. И именно мембранные сигналы запускают биохимические изменения, которые в конечном счете приводят к преобразованию ранее «молчавшей» клетки в активно функционирующую. Однако в настоящее время классическая мембранная теория радикально пересмотрена. Теоретически и экспериментально доказано [3], что объемную величину клетки поддерживают биофизические свойства связанной воды, представленной поляризованными мультислоями. Живая протоплазма (клетка) представляет трехмерную решетку воды, солей и протеина, способных мобилизоваться в фиксированно-зарядную систему (ФЗС) с помощью сил коротко- и дальнего действия. В молекуле белка пептидные связи взаимодействуют с диполями воды, являются матричной основой для структурирования клеточной воды с образованием водной оболочки. Поэтому обмен воды и ионов между клеткой и средой ограничен сплошной структурированной водой, а не мембраной. Сделан обобщенный вывод, что поверхностная мембрана живой клетки не является непрерывным диффузионным барьером в виде фосфолипидного бислоя, как полагали ранее, а представляет собой сеть полноразвернутых белков, поляризующих и структурирующих воду в сплошное поверхностное многослойное образование.

В окружающей биологические системы среде всегда существует постоянный фон различных излучений, физических полей, а также веществ. Природные физико-химические

факторы (ФХФ) являются «движущей силой» гомеостатических процессов. Исследования последних лет показывают, что даже минимальные изменения интенсивности природного фона ФХФ или добавление к ним других факторов (например, загрязненной в микродозах воды [4]) способны привести к регуляторным нарушениям, что и может быть основой для развития разнообразных заболеваний.

До недавнего времени не было предложено достаточно убедительно описанного механизма биологического действия низкоинтенсивных ФХФ. Имевшиеся отдельные предложения основывались на допущении пассивной диффузии биологически активных веществ (БАВ), результатом которой является взаимодействие одиночных молекул лигандов и клеточных рецепторов. Однако, во первых, согласно современным взглядам [3, 5, 6], межклеточное пространство представляет собой сложноорганизованный гель, включающий биополимеры в высокой концентрации и молекулы воды; естественно, пассивная диффузия молекул через такой гель затруднена и представляется маловероятным процессом. Во-вторых, характер биологических эффектов, вызываемых низкоинтенсивными ФХФ, указывает на то, что основа данного феномена – изменение процессов, обуславливающих прохождение регуляторного сигнала в биосистемах.

Высказано предположение о том, что все живые организмы обладают единообразно устроенной системой, функция которой заключается в восприятии, считывании, распространении и уничтожении информации, постоянно поступающей извне [5, 6]. Восприятие и все дальнейшие события, связанные с распространением регуляторного сигнала по соответствующей тканевой структуре и прохождением его в каждую отдельную клетку через системы вторичных мессенджеров, осуществляются благодаря изменениям пространственной организации надмолекулярных структур клеточного микро-окружения – микрогетерогенного геля. Этот гель, иначе малый матрикс, сформированный ассоциированными определенным образом между собой молекулами небольших белков (преимущественно гликопротеинов) и воды, присутствует не только во внеклеточном пространстве, но экспонирован на поверхности клеток и входит в состав цитоплазмы. Исключительной особенностью гликопротеинов является специфическое взаимодействие с молекулами воды, после которого отмечается появление колоколообразной дозовой зависимости действующего агента: проявление биологического эффекта в определенном диапазоне малых доз и его отсутствие при более высоких концентрациях. Предполагается, что существует некая особенность в структуре и конформации такой белковой молекулы, которая обуславливает наличие и проявление ею подобного свойства. Возможно, что именно сложный механизм взаимодействия молекул гликопротеинов и воды лежит в основе функционирования малого матрикса и объясняемого с этих позиций феномена действия низкоинтенсивных ФХФ. Пространственная организация малого матрикса, структура которого описывается в терминах жидкокристаллического состояния вещества, постоянно модифицируется за счет изменения свойств и концентрации входящих в него компонентов, в том числе и надмолекулярных ансамблей (кластеров) воды. В свою очередь структура водных кластеров в биосистемах может определяться, по-видимому, как внешним воздействием ФХФ, так и самих компонентов малого матрикса. Исходя из сказанного, можно заключить, что при воздействии одних и тех же ФХФ в зависимости от их доз в организме будут происходить совершенно разные события. В одном случае имеет место быстрая нейтрализация последствий оказанного воздействия. В другом – организм как бы не замечает оказываемого воздействия, но возникшие при восприятии и передаче регуляторного сигнала (информации) сдвиги в подсистемах приводят к развитию функциональных нарушений. Последние могут закрепиться в виде структурного следа уже соответствующего системного заболевания, способного стать предтечей гораздо более грозной болезни. Такая ситуация реализуется, например, если под влиянием неблагоприятных условий среды обитания оказываются индивидуумы с

генетически обусловленной предрасположенностью к какой-либо патологии, и тогда функциональные нарушения трансформируются в определенную болезнь. По мнению авторов теории единого механизма биологического действия низкоинтенсивных ФХФ, для проявления эффекта вовсе не обязателен физический перенос в пространстве каких-то молекул (процесс пассивной диффузии), так как в нормально функционирующих биосистемах участники биохимических реакций всегда присутствуют в необходимом для протекания той или иной реакции количестве в непосредственной близости (принцип компартментализации) – молекулы должны лишь согласованным образом пространственно расположиться относительно друг друга. Разрешение или запрет на протекание соответствующего процесса определяется состоянием надмолекулярной структуры среды (в данном случае водной), в пределах которой происходит это взаимодействие [5, 6].

Уже понятно, что низкоинтенсивные физические факторы эффективны в воздействии на биологические системы, поскольку действуют непосредственно на воду, входящую во все их надмолекулярные структуры [7]. Но в свете рассматриваемой концепции логично полагать, что любое воздействие на контактирующую с биообъектом воду является прямым путем взаимодействия с его системой восприятия и передачи информации. Такое воздействие может происходить при контакте с любым как физическим фактором, так и веществом. По-видимому, все химические вещества (независимо от их растворимости) в низких и сверхнизких концентрациях вызывают те или иные изменения в пространственной организации надмолекулярных ансамблей воды [3–6, 8]. Поэтому в биологические системы может поступать самая разнообразная информация. Ключевую роль в информационной фильтрации, вероятно, играет малый матрикс, а если точнее, то структура надмолекулярных ансамблей воды, интегрированных в этот гель. Пространственная реорганизация малого матрикса влечет за собой волну перестроек мембранных и других клеточных надмолекулярных структур.

Сравнительно недавно предложен непосредственный физический механизм переноса эффекта активации с воды на клеточные структуры при низкоинтенсивном воздействии ФХФ, который заключается в дальнедействующем переносе электронов по связанным (ассоциированным) состояниям воды в биологических жидкостях [4, 9]. Энергия взаимодействия естественных физических полей и излучений с биологическими объектами ничтожно мала по сравнению с энергией метаболических процессов и поэтому не может непосредственно заметно на них влиять. Например, энергия радиочастотных квантов существенно ниже энергии типичных химических связей и поэтому не вызывает их разрыва. Являясь не энергетическим, а информационным, такое воздействие способно оказать тонкое управляющее влияние на внутриклеточные процессы. Сигналы, поступающие таким образом в клетку, которая представляет собой сильно неравновесную насыщенную свободной энергией систему, могут, например, вызвать перераспределение скоростей внутриклеточных биохимических процессов [10]. Ответная реакция клетки, использующая ее собственные энергетические ресурсы, может быть достаточно сильной, соразмерной не столько с энергией первичного воздействия, сколько с ее информационной значимостью для клетки. Кроме того, очень малые изменения в динамике биологических структур, индуцированные слабыми внешними воздействиями, могут быть усилены за счет протекания необратимых процессов метаболизма. Учет особенностей функционирования биофизических структур в далеких от равновесия режимах также дает принципиальную возможность объяснения феномена малых доз и слабых воздействий [11]. Экспериментальными исследованиями доказано, что влияние на живые объекты слабых магнитных и электромагнитных полей осуществляется через воду. При этом эффекты сохраняются в течение часов или даже дней [12]. Таким образом, есть основания полагать, что именно наличие у воды ассоциированных

состояний позволяет ей воспринимать, хранить определенное время и передавать не только энергию, но и информацию. Иными словами, вода обладает «памятью», хотя данный факт в настоящее время в научных кругах является предметом дискуссий. Как известно, адаптивные и восстановительные процессы в организме во многом обеспечиваются и контролируются иммунной системой. Поэтому оценка функционального состояния циркулирующих иммунцитов может служить тем «зеркалом», в котором отражаются практически все адаптационные и патологические перестройки организма. Даже вне его иммунокомпетентные клетки (ИКК) сохраняют те структурно-функциональные характеристики, которые были определены *in vivo* их клеточным и гуморальным микроокружением. Эти свойства и особенности ИКК и использованы нами в создании экспериментальной модели, углубляющей, как мы надеемся, понимание механизмов энергоинформационного обмена в системе «биообъект – вода – окружающая среда».

Ранее, при исследовании нами свойств плазмы тлеющего разряда (ПТР), которая является разновидностью «холодной» (non-thermal) плазмы, был обнаружен биотропный эффект ее излучений и признаки того, что он опосредован водой [16, 17]. Поэтому, опираясь на эти данные, мы допустили, что даже малоинтенсивная физическая обработка воды может вызвать стойкое изменение ее структурного и физико-химического состояния, которое способно отразиться и на ее биологической активности. Было проведено изучение *in vitro* воздействия на ИКК низкоинтенсивного и низкоэнергетического физического фактора, в данном случае – излучений и полей ПТР. Воздействие проводилось не непосредственно на биообъект, а через воду. На облученной воде были приготовлены инкубационные среды для клеток и растворы полисахаридов пектинового ряда, которые являются перспективными кандидатами для разработки средств иммуномодулирующей терапии [15]. Для эксперимента были выбраны пектины, оказывающие супрессорное (комаруман СР) и стимулирующее (лемнан LM) действие на функциональную активность лейкоцитов [13–15]. Важно в этой связи подчеркнуть также то, что в ряде исследований показано, как многие эффекты воздействия слабых полей на биологические объекты можно воспроизвести, отдельно облучая чистую воду и лишь после этого внося в нее анализируемый объект – биополимеры, клетки, ткани, простейшие организмы [7, 18]. Питьевая негазированная вода Bonagua в герметичной упаковке (ПЭТ-бутылки емкостью 1 л) подвергалась обработке в течение 40 мин. в специально сконструированном плазмогенераторе при напряжении 1 КэВ. Интенсивность облучения была 1017 ионов на см². Температура образцов воды после облучения не превышала 35 °С. В качестве тест-объектов в исследованиях были использованы изолированные перитонеальные лейкоциты мышей.

Защитная роль лимфоцитов, макрофагов, гранулоцитов (ИКК) в организме общепризнана и изучается во многих аспектах. Установлено, что эти клетки претерпевают значительные изменения под влиянием различных агентов и факторов, которые часто обозначают термином «активация иммунокомпетентных клеток» [19, 20]. До настоящего времени феномен клеточной активации не обобщен, хотя он представляет большой интерес с точки зрения управления жизнедеятельностью клеток. Исследование феноменологии и механизмов активации ИКК преследует определенные цели. Одна из них – отбор и изучение различных иммуномодуляторов, воздействующих на состояние иммунной системы. Рациональному применению иммуномодулятора в клинике всегда предшествует предклиническое исследование его влияния на различные звенья ИКК *in vitro*. Лейкоциты из брюшной полости мышей выделяли следующим образом. Вводили внутривентриально по 5 мл охлажденного обычного фосфатно-буферного раствора (ФБР), содержащего 10 Ед./мл гепарина. После легкого массажа брюшной стенки извлекали экссудат из брюшной полости. Определяли количество клеток, дифференцируя лимфоциты, моноциты и нейтрофилы в камере Горяева. Окрашивание клеток проводили красителем Задорожного-Дозморова. Суспензию клеток (100 мкл) инкубировали в лунках

плоскодонного планшета в течение 30 мин. при 4 °С и затем 90 мин. при 37 °С в присутствии полисахаридов, растворенных в обычной или облученной ПТР воде (ОВ). Для стимуляции клеточной активности использовали форболовый эфир миристиновой кислоты (0,025 мг/л). Количество прикрепившихся клеток определяли колориметрическим методом. Клеточный монослой фиксировали на пластике 96%-ным этиловым спиртом по 100 мкл на лунку в течение 30 мин. После фиксации спирт удаляли и планшет высушивали. Клетки заливали краской Романовского-Гимза по 100 мкл на лунку и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Затем краску удаляли, а клеточный монослой отмывали трижды физраствором (рН 7,2–7,4) от не включившегося в клетки красителя. К окрашенным клеткам добавляли по 100 мкл метанола. После полного растворения красителя измеряли оптическую плотность (OD) раствора при длине волны 650 нм и референсной длине волны 492 нм с помощью спектрофотометра PowerWave 200 (BioTek Instruments, США). Результаты проведенного исследования отражены на рис. 1–4. Результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что перитонеальные лейкоциты находятся в жизнеспособном состоянии и адекватно отвечают на стимуляцию форболовым эфиром миристиновой кислоты (ФЭ). Воздействие ФЭ вызывает почти трехкратное повышение адгезивности лейкоцитов. Выявлено, что добавление к клеточной суспензии воды, облученной ПТР (ОВ), усиливает как спонтанную, так и стимулированную адгезию клеток (рис. 2). Спонтанная адгезия лейкоцитов после контакта с ОВ увеличивается на 37±3% (p<0,05, n=7), а стимулированная ФЭ адгезия – на 16±7% (p<0,05, n=7). Очевидно, что ОВ влияет на физиологию клеток. Возможно, она модифицирует свойства плазматической мембраны, что проявляется в повышенной неспецифической адгезии ИКК, а также в увеличении их чувствительности к ФЭ. Возрастание клеточной адгезии может достигаться как за счет изменения электростатического взаимодействия мембраны с субстратом, так и за счет экспрессии на мембране дополнительного количества рецепторов адгезии.

Установлено, что комаруман СР снижает стимулированную ФЭ адгезию лейкоцитов (рис. 3). Использование ОВ ингибирует это свойство комарумана СР, адгезивность клеток возрастает и становится сопоставимой с контрольными значениями (рис. 1, 3; 2б). Выявлено, что комаруман СР не влияет на уровень спонтанной адгезии лейкоцитов (рис. 3). Лемнан LM усиливает адгезию клеток, при этом количество адгезированных клеток увеличивается в два раза по сравнению с контрольными значениями (рис. 1, 4). Стимуляция лейкоцитов ФЭ после инкубации с лемнаном LM не вызывает увеличения количества адгезированных лейкоцитов, но при совместной инкубации перитонеальных лейкоцитов с лемнаном LM и ОВ происходит повышение адгезии, стимулированной ФЭ (рис. 4). Из анализа полученных результатов следует, что активированная ПТР вода способна модулировать и биологическую активность пектиновых полисахаридов в отношении ИКК. Точнее, имеет место синергетический эффект. Иными словами, в экспериментальной системе мы наблюдаем, во первых, активирующий эффект низкоинтенсивного физического фактора в отношении воды, во вторых, перенос эффекта активации с воды на ИКК и, в третьих, особое взаимодействие активированной воды с молекулами-носителями регуляторного сигнала, воспринимаемого ИКК. В свете рассматриваемой концепции, то есть необязательности физического переноса в пространстве молекул БАВ, мы полагаем, что иммуномодулирующая роль пектинов в наших условиях может выполняться и надмолекулярными ансамблями реструктурированной воды, образовавшимися под воздействием молекул пектинов как биокатализаторов и проявляющими их свойства в виде «фантомов». Поскольку в наших экспериментах задействована гетерогенная по составу популяция ИКК, то невозможно исключить вероятность участия в межклеточных взаимодействиях в ней, например, по типу цитокинового обмена, таких же «фантомных» цитокинов.

Трактовка результатов, связанных с цитоиммунными механизмами, вызывает определенную сложность и обусловлена отчасти тем фактом, что существует несколько

вариантов взаимодействия пектиновых полисахаридов с иммунной системой. Некоторые из них приводят к усилению, а другие – к снижению функциональной активности лейкоцитов. Способность понижать иммунную реактивность обусловлена областью галактуронана, образующего главную углеводную цепь всех пектинов. Именно тонкое строение боковых углеводных цепей пектинов определяет их способность стимулировать лейкоциты. Иммуносупрессорную активность проявляют свободные карбоксильные группы высокомолекулярных фрагментов галактуронана. Чтобы оценить значение данного факта, необходимо на время вернуться в область физической химии воды и водных систем. Если обратиться к физической модели жидкофазного состояния воды, то нужно выделить тот момент, что она имеет в своем составе объемную и связанную фазы (гетерофаза), при этом последняя при наличии униполярных зарядов и парамагнитных частиц играет роль энергоинформационного передатчика в системе и регулирует состояние вещества. Такие свойства гетерофаз проявляются в ряде нелинейных процессов, в результате которых тепловая, акустическая, электромагнитная, электрическая и магнитная энергия сверхслабых внешних полей способна преобразовываться в энергию ион-радикалов ($H^{+(*)}$, $OH^{-(*)}$, $O_2^{-(*)}$, $HO_2^{-(*)}$ и др.), которые накапливаются в связанных состояниях вещества [4, 9]. Поэтому вода и обладает амфотерными свойствами, то есть она может выступать как в роли кислоты, так и основания. Это позволяет ей быть, с одной стороны, акцептором протонов, а с другой – их донором.

Оттягивание электронной плотности от карбоксильного атома водорода в активированной воде ослабляет связь О-Н. Вследствие этого карбоксильная группа способна отщеплять (терять) протон. Образующийся карбоксилат-ион можно рассматривать как гибрид двух резонансных структур:

или иначе

Поскольку в результате преобразования в ион-радикальную форму карбоксильные группы галактуронанов приобретают повышенную реактоспособность, то облученная подобным образом плазмой тлеющего разряда вода, то есть активированная, может усиливать или, наоборот, ингибировать иммуносупрессорную активность галактуронановых фрагментов в зависимости от других реакционных условий. Это один из примеров возможных путей биомедицинского приложения управления свойствами воды. В заключение остается выразить осторожный оптимизм, что возможность управления состояниями воды позволит осуществлять разработку методов регулирования и поддержания различных метаболических процессов в организме как в профилактических, так и в лечебных целях.

Авторы посвящают эту статью памяти академика РАН Ю. С. Оводова, инициатора и куратора настоящих исследований, не дожившего до завершения работы.

Литература

1. Cell Biology of Extracellular Matrix / Ed. by E. D. Hay. – N. - Y. - L., 1982.
2. Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins / Ed. by T. Kreis, R. Vale. – O. - Y. - G., 1993.
3. Линг Г. Физическая теория живой клетки: незамеченная революция. – СПб., 2008.
4. Рахманин Ю. А., Стехин А. А., Яковлева Г. В. Структурно-энергетические изменения воды и ее биологическая активность // Гигиена и санитария. 2007, №5. С. 34–36.
5. Ямсков И. А., Ямскова В. П. Фармакологические препараты нового поколения на основе гликопротеинов клеточного микроокружения // Росс. Хим. Журнал (ЖРХО им. Д. И. Менделеева). 1998. Т. 62, №3. С. 85–90.
6. Ямскова В. П., Ямсков И. А. Механизм биологического действия физико-химических факторов в сверхмалых дозах // Росс. Хим. Журнал (ЖРХО им. Д. И. Менделеева). 1999. Т. 43, №2. С. 74–79.

7. Goldsworthy A., Whitney H., Morris E. Biological effects of physically conditioned water // *Water Res.* 1999. V. 33, №7. P. 1618–1626.
8. Смирнов А. Н., Лапшин В. Б., Балышев А. В. и др. Структура воды: гигантские гетерофазные кластеры воды // *Химия и технология воды.* 2005, №2. С. 11–37.
9. Яковлева Г. В., Стехин А. А., Рахманин Ю. А., Кондратов В. К. Электромагнитная модель транспорта электронов в водных средах / VI междунар. конгресс «Вода: Экология и технология»: тез. докл. – Москва, 14 июня 2004 г. С. 1010–1013.
10. Ершов Ю. А., Мушкамбаров Н. Н. Кинетика и термодинамика биохимических и физиологических процессов. – М., 1990.
11. Бинги В. Н. Ядерные спины в первичных механизмах биологического действия магнитных полей // *Биофизика.* 1995. Т. 40, вып. 3. С. 553–559.
12. Капель-Боут К. Факторы окружающей среды, ответственные за флуктуационные явления. Трудности восприятия соответствующих фактов научным сообществом // *Биофизика.* 1995. Т. 40, вып. 4. С. 732–735.
13. Popov S. V., Ovodova R. G., Ovodov Yu.S. Effect of lemnan, pectin from *Lemna minor* L., and its fragments on inflammatory reaction // *Phytother. Res.* 2006b. Vol. 0. P. 403–7.
14. Popov S. V., Popova G. Yu., Ovodova R. G., Ovodov Yu.S. Antinflammatory activity of the pectic polysaccharide from *Comarum palustre* // *Fitoterapia.* 2005b. Vol. 76. P. 281–7.
15. Оводов Ю. С. Современные представления о пектиновых веществах // *Биоорганическая химия.* 2009. Т. 35. С. 293–310.
16. Терешко И., Горчаков А., Обидина О., Толстая Е., Терешко В., Редько В. Биомедицинский потенциал холодно-плазменной технологии // *Наука и инновации.* 2012, №8(114). С. 62–66.
17. Tereshko V., Gorchakov A., Tereshko I., Abidzina V., Red'ko V. Biomedical Applications of Materials Processed in Glow Discharge Plasma / *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications.* Ed. by R. Pignatello. – InTech. 2013. P. 3–21.
18. Катин А. Я. Длительность влияния воды, заряженной миллиметровым воздействием, на организм человека // *Миллиметровые волны в биологии и медицине.* 1996, №8. С. 63–64.
19. O'Brien R.L., Parker J. W., Dixon J. F.P. Mechanism of lymphocyte stimulation / *Progress in molecular and subcellular biology.* Ed. by F. F. Hagn et al. – Berlin, 1978. Vol. 6. P. 201–270.
20. Ляшенко В. А., Дрожеников В. А., Молотковская И. М. Механизмы активации иммунокомпетентных клеток. – М., 1988.