

# **Wpływ niskociśnieniowej plazmy na aktywność biologiczną immunocytów**

Igor Elkin

Nantes Ltd, Bolesławiec, Polska

## ***Abstrakt***

W pracy zostały przedstawione rezultaty badań wpływu pola niskociśnieniowej zimnej plazmy na aktywność biologiczną immunocytów. Wykazano pozytywny wpływ zimnej plazmy na zachowanie immunocytów w stanach chorobowych.

## ***Wprowadzenie***

Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały istotny wpływ pola niskociśnieniowej (NC) zimnej plazmy na strukturę różnych materiałów, m.in. metali i stopów. Strumień jonów i elektronów o energiach 0,5-5 keV wytwarzany w plazmatronie (generatorze plazmy) powoduje objętościową modyfikacji tych materiałów, przejawiającą się w podwyższeniu charakterystyk ich wytrzymałości prawie do głębokości 10 mm [1-4]. Struktura metali i stopów poddanych obróbce plazmowej jest analogiczna do struktury głęboko deformowanych próbek, chociaż w procesie napromieniowania materiały nie są poddawane ani mechanicznym ani termicznym obciążeniom. Należy wspomnieć, że taka efektywna modyfikacja materiałów nie jest możliwa nawet przy bardzo wysokiej energii bombardujących cząstek, rzędu kilku MeV, gdzie głębokość modyfikowanej warstwy nie przewyższa 100  $\mu\text{m}$ .

Wpływ pola NC plazmy na własności fizykochemiczne wody był również przedmiotem wielu badań. Wiadomo, że charakter oddziaływania przyspieszonych jonów na powierzchnię materiału istotnie zależy od energii jonów. Przy inicjacji plazmy w obecności resztkowych gazów, po osiągnięciu krytycznych wartości napięcia pola elektrycznego  $E_c$  i ciśnienia  $P_c$ , powstaje stacjonarny reżim istnienia plazmy ze stałą koncentracją jonów. Przy różnicy potencjałów między elektrodami wynoszącej 0,6-2,5kV, odległości między elektrodami 0,3-0,5 m i ciśnieniu  $10^{-6}\text{Pa}$  średnia energia jonów nie przekracza  $2,5 \times 10^3$  eV. W tych warunkach, w płynach ulokowanych w sąsiedztwie katody w wodoszczelnych pojemnikach, pod wpływem plazmy zachodzą się

różnorodne fizyczno-chemiczne i fizyczno-mechaniczne procesy prowadzące do zmian strukturalnych cieczy.

Wpływ pola NC plazmy na obiekty biologiczne przejawia się również w tak zwanym inspirującym efekcie. Na przykład, napromieniowanie, lub po wpływie napromieniowanej wody, nasion różnych ogrodowych kultur (przy napięciu generatora  $U = 2400-2700$  V, gęstości jonowego potoku w komorze  $R = 2,5 \times 10^6$  jonów/cm<sup>2</sup> i czasie napromieniowania  $t = 20$  min.), wykazało podwyższoną (w porównaniu do próbek kontrolnych) zdolność kiełkowania, żywotność i wegetatywny wzrost. U napromieniowanych w takich samych warunkach drobnoustrojów (mleczno-kwaśne bakterie, jednokomórkowe i wielokomórkowe drożdże) zauważono intensyfikację procesów biosyntetycznych, rozmnażania i zmiany morfologiczne, co świadczy o fizjologicznych przemianach zachodzących pod wpływem zimnej plazmy.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu niskociśnieniowej zimnej plazmy na immunokompetentne komórki krwi (immunocyty). Do klasy immunokompetentnych komórek zalicza się limfocyty oraz makrofagi, jednakże biorąc pod uwagę ich ścisły funkcjonalny związek w reakcjach odpornościowych, zalicza się do nich także często wieloziarniste leukocyty.

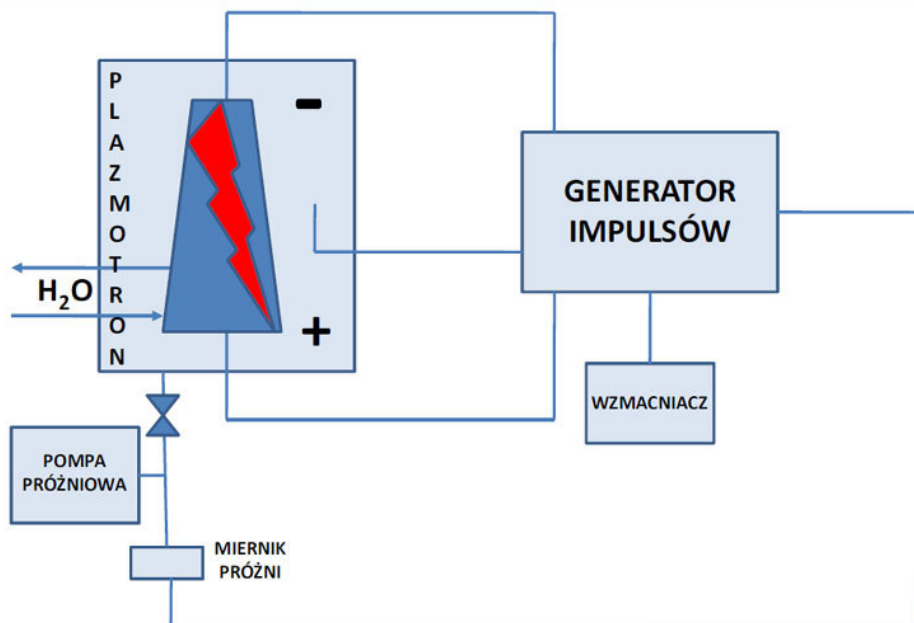
Szczególną uwagę poświęcono analizie wpływu pola NC plazmy *in vitro* na immunocyty chorych o różnym przebiegu choroby, a także z onkologiczną formą patologii o różnej genezie, która pojawia się w warunkach niewystarczającej efektywności ochrony immunobiologicznej.

### ***Wyniki eksperymentalne i dyskusja***

Badania układów biologicznych poddanych działaniom NC plazmy przeprowadzano w szklanych, kwarcowych i plastikowych probówkach, tak w stanie suchym, jak i w wodnych roztworach immunocytów. W celu oceny zachowania się immunocytów poddanych działaniu pola NC plazmy zastosowano podejście i metody oparte na luminescencyjnej mikrospektralnej analizie komórek z użyciem fluoroscencyjnych sond. Taki sposób analizy, na przykład, fluorochromowanych oranżem akrydynowym (AO) żywych komórek, jest efektywny w rozpoznawaniu procesów patologicznych i kontroli procesu leczenia. AO używa się jako wskaźnik immunokompetentnych komórek krwi, ponieważ posiada on właściwości metachromatyczne, pozwalające na dokładne śledzenie różnych aspektów ich czynności fizjologicznych.

Analiza otrzymanych rezultatów wskazuje, że mimo obecności bariery przed badanym obiektem, ma miejsce rzeczywista odpowiedź żywych komórek na oddziaływanie pola NC plazmy. Nie wyklucza się oddziaływania pośredniego, tzn. zjawiska przenoszenia efektu z materiałów stanowiących

barierę na badany obiekt. Przede wszystkim odnosi się to do roztworów wodnych, ponieważ zauważalna jest zmiana fizyko-chemicznych właściwości wody pod wpływem pola NC plazmy.



Rys. Schemat stanowiska do obróbki plazmowej wody.

W przeprowadzonych eksperymencie zbadany został wpływ oddziaływania NC plazmy na immunocyty krwi zdrowego człowieka i chorego w chronicznym procesie zapalnym (immunoobwodowe zapalenie gruczołów). Wiadomo, że intensywności luminescencji fluorochromowanych AO żywych komórek, odpowiadających długości fali 540 nm określają fizyko-chemiczny (strukturalno-fizjologiczny) stan chromatyny, gdzie AO wiązuje się z DNA w monomerycznej formie charakteryzowanej przez długość fali  $\lambda = 640$  nm - analogiczny stan ich lizosomatycznej struktury, w którym AO nagromadza się już w nadmiarowej ilości i odzwierciedla w ten sposób, ogólny poziom aktywności komórek. Na podstawie otrzymanych danych można wnioskować, że NC plazma posiada stymulujący potencjał w stosunku do immunokompetentnych komórek. Swoimi zewnętrznymi przejawami efekt ten przy luminescencyjnej mikrospektralnej analizie żywych komórek przypomina wczesne stadia aktywacji immunocytów przez takie czynniki jak lektyny. To, że immunokompetentne komórki doświadczają znacznych fizyko-chemicznych, biochemicznych i morfologicznych zmian pod wpływem antygenów albo mitogenów, tzn. czynników, pojawiających się w warunkach infekcji, intoksykacji albo innych zaburzeń homeostazy organizmu są dobrze udokumentowane. Takie zmiany zwykle określa się

terminem "aktywacji immunokompetentnych komórek".

Duża część limfocytów krwi posiada zdolność do rozmnażania się i podziałów w komórki immunokompetentne albo intensyfikacji metabolicznej (funkcjonalnej) aktywności. Natomiast monocyty/makrofagi są mało zdolne do namnażania się (jeśli w ogóle są zdolne), jednakże mogą się różnicować w komórki aktywniej fagocytujące i wykazujące wyższą adhezję komórek. Dojrzałe granulocyty nie są zdolne ani do dzielenia się, ani do różnicowania się, ale mogą intensyfikować swoją funkcjonalność.

Aktywacja immunocytów jest koniecznym warunkiem ich udziału w reakcjach ochronnych organizmu. Sygnałem do aktywacji jednocześnie wielu immunokompetentnych komórek jest oddziaływanie określonego "aktywatora". Jedne aktywatory mają szeroki zakres działania - wpływają na różnorodne komórki (na przykład, lektyny); inne w większym stopniu specjalizacji - działają na pojedyncze subpopulacje komórek (cytokiny). Wspólną jakościową cechą oddziaływania jest szybkie przejście, w miarę dużej subpopulacji immunokompetentnych komórek, w nową formę.

Termin "aktywacja" zwykle ma dwa aspekty: po pierwsze, używa się go do określenia metastabilnego procesu, który kończy się rozmnażaniem i różnicowaniem komórek, po drugie, do określenia zmian, zachodzących w immunokompetentnych komórkach podczas pierwszych minut po oddziaływaniu aktywatorów. Na obecnym etapie badań skupimy uwagę się na drugim aspekcie.

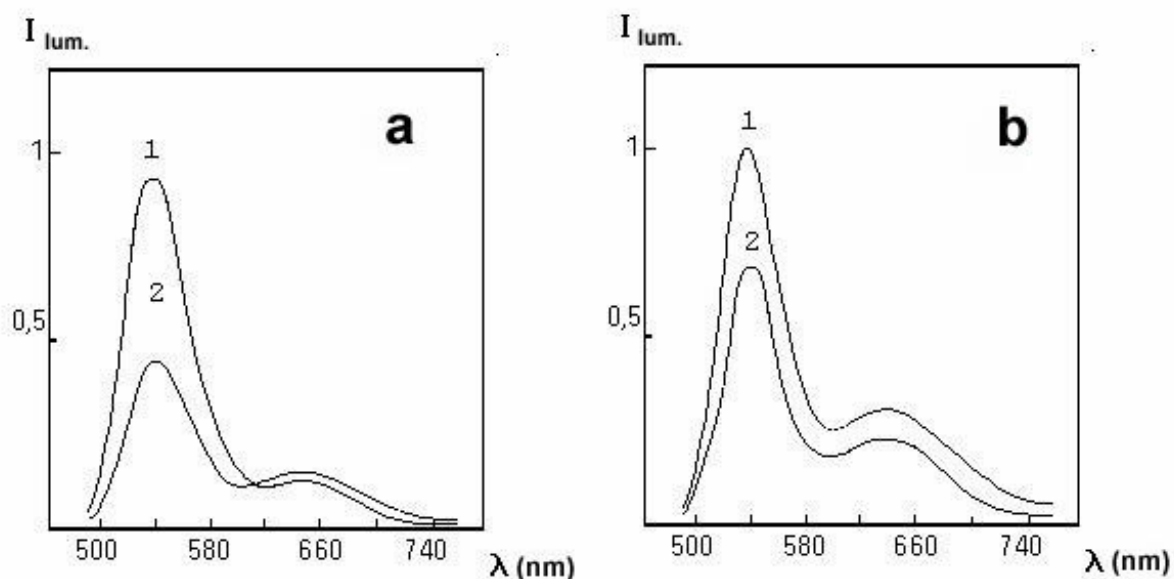
Na podstawie rezultatów wcześniejszych naszych badań można przypuszczać, że ogólny wizerunek aktywacji antygenami i mitogenami jest bardzo podobny. To daje możliwość ekstrapolacji rezultatów pracy z mitogenami na aktywację immunokompetentnych komórek. Jednakże w naszej sytuacji analiza immunocytów w utrwalonej formie świadczy o nieidentyczności ich reakcji na oddziaływania mitogenu (lektyna) i NC plazmy. Jest wysoce prawdopodobnym, że to z jednej strony, w jakiejś mierze, związane jest z ich pierwotnie różnym stanem funkcjonalnym u zdrowych i chorych osobników, a z drugiej - z inicjacją całkowicie różnych genetycznych programów zachowywania się komórek.

Jak wiadomo lektyny (ConA, FGA LPS i in.) są stymulatorami mitotycznej aktywności w limfocytach, tzn. inicjują procesy biosyntezy RNA, DNA, białek, niezbędnych dla komórkowej proliferacji. U dojrzałych wielojądrzastych leukocytów reakcja na lektyny, prawdopodobnie ogranicza się tylko pierwotnie do fizyko-chemicznych zmian stanu komórki. Obserwujemy to u zdrowego człowieka, kiedy immunocyty znajdują się w stanie względnego funkcjonalnego spoczynku. W normalnym stanie *in vivo*

limfocyty, otrzymując odpowiedni aktywacyjny sygnał do rozmnażania i różnicowania się, opuszczają tryb cyrkulacji i przechodzą do limfotycznych narządów w celu zakończenia reakcji, stając się faktycznie niedostępnymi dla zwykłej immunohematologicznej analizy. W patologii, w warunkach zwiększonych obciążeń funkcjonalnych, immunocyty (limfocyty) pozostają we krwi i realizują inny genetyczny program, wyłączający podział, ukierunkowany na podwyższanie swojej prostej fizjologicznie pożądanej aktywności, tak jak to zachodzi przy każdej adaptacyjnej reakcji organizmu.

W elastycznej adaptacji organizmu do jakichkolwiek nadzwyczajnych oddziaływań podstawową rolę gra także intensyfikacja syntezy kwasów nukleinowych i białek. Pierwszym i kluczowym etapem tego procesu, zwłaszcza przy immunogenezie, jest synteza RNA, która poprzedza biosyntezę białek. W funkcjonalnym stanie spoczynku w immunocytach zachodzi tylko biosynteza, która mocno aktywuje się przy funkcjonalnym obciążeniu komórki.

Na rys. 2 przedstawiono wpływ pola NC plazmy na fluorescencję limfocytów krwi zdrowego (1) i chronicznie chorego (2) człowieka.

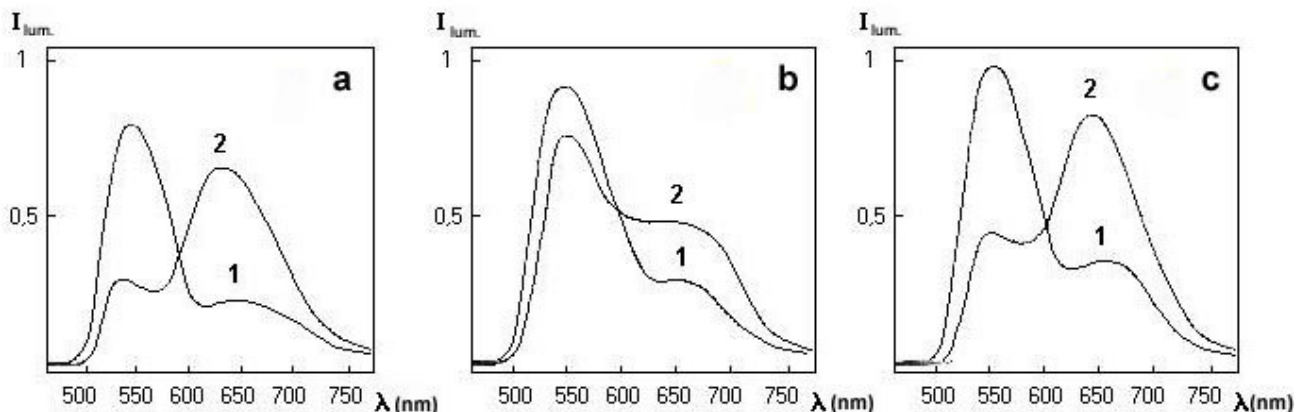


Rys. 2. Fluorescencja żywych limfocytów krwi zdrowego człowieka (1) i chronicznie chorego (2) przed (a) i po (b) oddziaływaniu NC plazmy.

Można zauważyć, że w przypadku zdrowego człowieka stosunek intensywności pasma fluorescencji przy 540nm do pasma położonego przy 650 nm jest znacznie wyższy w porównaniu z człowiekiem chorym. Po

podaniu wpływowi pola NC plazmy intensywność wysokoenergetycznego pasm fluorescencji chorego człowieka przy 540 nm ulega znacznemu zwiększeniu w porównaniu ze zdrowym.

Na rys. 3 przedstawiono porównanie zmian fluorescencji krwi zdrowego zachodzących pod wpływem pola NC plazmy.



Rys. 3. Fluorescencja limfocytów krwi zdrowego człowieka (1) i chronicznie chorego (2) bez oddziaływań (a), przed i po poddaniu oddziaływaniem NCplazmy (b), oraz po poddaniu leczeniem lektyną (c).

Można zauważyć, że wysokoenergetyczne pasmo fluorescencji z maximum przy 540nm jest znacznie intensywniejsze niż pasma położonego przy 650nm. Całkiem odwrotna sytuacja ma miejsce u chronicznie chorego osobnika. Po poddaniu limfocytów obróbce NC plazmą ma miejsce odwrócenie intensywności obu pasm fluorescencji w przypadku chorej osoby, ponieważ następuje silny wzrost intensywności pasma przy 540nm kosztem intensywności pasma przy 650nm. Nie obserwuje się znaczących zmian rozkładu intensywności fluorescencji limfocytów w przypadku zdrowej osoby. Świadczy to, że obróbka limfocytów jest bardziej znacząca w przypadku chorych osób. Dla porównania na rys. 3c przedstawiono wpływ leczeniem substancją lektynową na zachowanie limfocytów osoby chorej, pod wpływem której, następuje wzrost intensywności pasma przy 540 nm, świadczący o ustąpieniu przyczyn stanów chorobowych.

W przypadku syntezy DNA jest wiadomym, że immunocyty krwi znajdują się w fazie G<sub>0</sub> komórkowego cyklu i nie syntetyzują go de novo. Dlatego, indykatorem biosyntetycznej aktywności immunocytów krwi (w danym przypadku limfocytów i monocytów) może być wewnątrzkomórkowy stosunek RNA/DNA, który można ilościowo ocenić przy pomocy luminescencyjnej mikrospektralnej analizy poddanych specjalnej obróbce

(utrwalonych) i fluorochromowanych AO indywidualnych komórek. W spektralnej analizie ten stosunek może być wyrażony przy pomocy relacji, określającej względny stosunek intensywności fluorescencji

$$\alpha = I_{640} / I_{530}$$

gdzie  $I_{640}$  to intensywność luminescencji komórek na długości fali 640 nm, a  $I_{530}$  oznacza intensywność luminescencji komórek na długości fali 530 nm.  $\alpha$  jest spektralnym parametrem, który może służyć jako wskaźnik ich ogólnej biosyntetycznej aktywności.

### ***Podsumowanie***

Studia fenomenologii i mechanizmów aktywacji immunocytów mają na uwadze kilka celów. Jednym z nich jest ocena wyjściowego stanu populacji immunokompetentnych komórek, zwłaszcza w warunkach klinicznych. Drugim jest ustanowienie korelacji między charakterem wczesnych i idących w ślad za nimi zmian w immunokompetentnych komórkach pod wpływem różnych aktywatorów. Trzecim jest znalezienie sposobów sterowania zachowaniem się immunokompetentnych komórek.

System immunologiczny, jak wiadomo, w najbardziej bezpośredni sposób zabezpiecza i kontroluje adaptacyjne i regeneracyjne procesy organizmu. Dlatego, krążące w obiegu krwi komórki systemu odpornościowego, spełniające w organizmie kontrolujące i homeostatyczne funkcje, mogą równocześnie służyć jako zwierciadło raportujących funkcji organizmu, w którym odbijają się praktycznie wszystkie adaptacyjne i patologiczne procesy życiowe organizmu. Nawet wydalone z organizmu immunokompetentne komórki krwi zachowują te strukturalno-funkcjonalne właściwości in vivo z ich komórkowym i humoralnym mikrootoczeniem.

Można spróbować wykorzystać tę właściwość immunocytów do kontrolowanej immunokorekcji przy patologii, na przykład przez wykorzystanie pola NC plazmy. Co więcej, biorąc pod uwagę wielofunkcyjność systemu odpornościowego, można oczekiwać przy tym i szerszego zakresu fizjologicznych zmian w organizmie, co prawdopodobnie, podniesie terapeutyczną celowość podobnego oddziaływania.

Skuteczne leczenie chronicznych chorób zawsze przedstawiało sobą jedno z najbardziej złożonych zadań, rozwiązanie, którego opiera się na nieustannym doskonaleniu tak metodologicznych, jak i metodycznych procedur. Nieodzownym warunkiem sukcesu w takim przedsięwzięciu jest wczesna

diagnoza chorób i odpowiednia terapia.

Wiadomo, że nie tylko zaburzenie reakcji ustrojowych ale również inicjacja procesów regeneracyjnych organizmu może być wywołana przez oddziaływania zewnętrzne. Stwierdzono, że przy krótkotrwałym oddziaływaniu NC plazma może działać stymulująco na fizjologię organizmu. Należy nadmienić, że do pełnego zrozumienia molekularno-komórkowych mechanizmów oddziaływania pola NC plazmy droga jest jeszcze niestety daleka.

### ***Podziękowania***

Autor chciałby podziękować swoim kolegom z Uniwersytetu w Mohylewie (Białoruś) p. dr . I. Tereshko i V. Abidzinie za pomoc w przeprowadzeniu doświadczeń i w dyskusji wyników.

### **Literatura**

- [1] V. Abidzina, I. Deliloglu-Gurhan, F. Ozdal-Kurt, B.H. Sen, I. Tereshko, I. Elkin, S. Budak, C. Muntele, D. Ila, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B262, 624, 2007.
- [2] I. Tereshko, V. Abidzina, A. Tereshko, I.E. Elkin, B261, 678, 2007.
- [3] I. V. Tereshko, V. Abizina et al. Vestnik NU, Sol. St. Phys. 1(8), 70, 2005.
- [4] A.A. Vostrikov, D.Yu., Dubov, M.R. Preddteschensky, Chem.Phys. Lett.139, 124, 1987.