

ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ АРГОНОВОЙ ПЛАЗМЫ НА СКОРОСТЬ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЛАНАРИЙ

¹Ермаков А.М., ¹Ермакова О.Н., ¹Маевский Е.И., ²Васильев М.М., ²Петров О.Ф., ²Фортов В.Е.

¹*Учреждение Российской академии наук Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН Пущино, Московская обл., 142290, ул. Институтская д.3;*

²*Учреждение Российской академии наук Объединенный институт высоких температур РАН, Москва, 125412, Ижорская ул., 13, стр.2.*

E-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Резюме: Исследовано действие низкотемпературной (не выше 40°C) аргонной плазмы, генерируемой СВЧ генератором, на процесс регенерации в классической биологической модели - плоских червях планарий. Найден режим, отличающийся от стерилизующего, при котором 2-х и 5-минутное облучение регенерирующих планарий низкотемпературной аргонной плазмой приводит к стимуляции роста головной бластемы. Таким образом, показана возможность с помощью низкотемпературной аргонной плазмы оказывать стимулирующее действие на пролиферацию стволовых клеток в регенерирующих тканях животных *in vivo*.

Ключевые слова: низкотемпературная аргонная плазма, планарии, регенерация, стволовые клетки.

INFLUENCE OF LOW TEMPERATURE ARGON PLASMA ON THE RATE OF PLANARIAN REGENERATION

¹Ermakov A.M., ¹Ermakova O.N., ¹Maevsky E.I., ²Vasilev M.M., ²Petrov O.F., ²Fortov V.E.

¹*The Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russia Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia*

²*The Joint Institute for High Temperatures of Russian Academy of Sciences, Moscow, 125412, Russia*

E-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Summary: We investigated the effect of low-temperature argon plasma on the regenerative processes in the classical biological model - flatworm planarian. It were found regimes, differ from sterilization, during which 2 or 5-minute irradiation of the low-temperature argon plasma stimulates the regenerating planarians, accelerates growth of the head blastema. Thus, we revealed the possibility of using special regime of low-temperature plasma for activation of stem cells in regenerating tissues *in vivo*.

Key words: low temperature argon plasma, planarian, regeneration, stem cells.

Введение. В настоящее время низкотемпературная газовая плазма (НТП) в диапазоне до 700°C все шире находит применение в производственной и медицинской практике в качестве стерилизующего средства, деструктора ткани в виде плазменных скальпелей, коагуляторов, инструментов для туннелирования тканей [1]. При клиническом использовании НТП для дезинфекции раневой поверхности возникает ряд сопряженных проблем: безопасность, эффективность и воспроизводимость лечебного действия. Необходимо, чтобы воздействие НТП, обеспечивая разрушение микроорганизмов, могло бы способствовать регенерации тканей или, по крайней мере, не тормозить этот процесс [2-5]. Сложность подбора необходимого режима НТП *in vivo* заключается в том, что НТП является многофакторным воздействием, для тестирования которого требуется разработка и использование множества медико-биологических моделей.

Основные действующие факторы НТП включают электромагнитные поля и несколько видов облучений, различные химических агентов. Это не только СВЧ, ультрафиолетовое (УФ) и инфракрасное (ИК) излучение, но и потоки свободных электронов, ионов, нейтральных атомов и молекул, продуктов взаимодействия плазменного луча с окружающим воздухом и образование ряда (в том числе не идентифицированных) химических соединений в результате воздействия на биологические ткани. В частности, под воздействием воздушной плазмы образуется множество свободных радикалов кислорода и азота. Поэтому нами использована низкотемпературная аргоновая плазма (НТАП), минимальным образом инициирующая образование свободных радикалов.

На уровне животных для оценки эффектов компонентов НТАП требуется создание сложных патофизиологических моделей, сочетающих возможность исследования широкого ряда биологических процессов. В настоящее время не существует адекватной биологической модели для исследования в условиях *in vivo* интегрального воздействия плазменного потока на клетки и ткани организма животных. Кроме того, открытым остается вопрос о правомерности и адекватности экстраполяции результатов, получаемых на более простых объектах, на уровень высших животных и человека. Представленные нами ранее данные о механизмах гормональной регуляции стволовых клеток планарий [6], подтвердили высокую степень консервативности в филогенезе, преемственность и, следовательно, общность механизмов, контролирующих процессы регенерации у планарий

и у высших животных [7]. Поэтому и возникла возможность использования значительной части данных, получаемых при исследовании регенерации планарий, для экстраполяции на животных более высокого уровня организации. Простота обращения с планариями и их биологическая «полноценность» обратили наше внимание на этот объект для изучения интегративных механизмов биологического воздействия НТП на животных *in vivo*. Пресноводные плоские черви планарии обладают уникальной способностью к регенерации утраченных частей тела за счет обилия стволовых клеток - необластов. Поэтому планарии считаются адекватной моделью для изучения основных биологических процессов на уровне стволовых клеток при регенерации в условиях целостного организма [8].

Цель работы: исследование на уровне регенерирующих планарий новых режимов воздействия низкотемпературной аргоновой плазмы, которые не вызывают гибель животных, но могут способствовать сохранению или ускорению течения процесса регенерации тканей животных.

Материалы и методы.

В качестве СВЧ генератора низкотемпературной аргоновой плазмы (НТАП) использовали исследовательскую установку MicroPlaSter β, изготовленную фирмой «AD'TEK Plasma Technology Co.Ltd.», предоставленную в ИТЭБ РАН Объединенным Институтом Высоких Температур РАН (Москва) при содействии Max Planck Institut für extraterrestrische Physik (Ringberg, Германия). Параметры плазмы были гомогенными по площади при диаметре плазменной струи 30 мм на расстояниях 20 мм от выходного отверстия горелки, при ненулевой величине плавающего потенциала сетки температура выходящей струи газа ниже 40°C; при использовании чистого аргона (99,9%) в газовом потоке обнаружены микропримеси NO₂; мощность УФ облучения (309 нм и 316 нм) составляет 80 мкВт/см², излучение в красной и инфракрасных (ИК) областях менее 40 мкВт/см². Для получения плазмы использовался высокоочищенный аргон (99.998 %), протекающий через СВЧ горелку со скоростью 2.2 слм (стандартных литров в минуту). Биологическая часть исследования выполнена на планариях *Schmidtea mediterranea* (*Platyhelminthes*, *Triclada*) (рис. 1, а), бесполой лабораторной расе плоских червей. Планарий содержали в прудовой воде при комнатной температуре и кормили раз в неделю личинками двукрылых. Для экспериментов отбирали животных длиной около 8 мм и

прекращали их кормление за 7 дней до опытов. Регенерация вызывалась ампутацией 1/5 части тела планарий, содержащей головной ганглий, в области непосредственно за глазами. Регенерирующие планарии после воздействия потока аргона и холодной плазмы помещались в стеклянные стаканы (по 30 особей на стакан), содержащие по 20 мл прудовой воды. Температура воды в экспериментальном и контрольном стаканах поддерживалась одинаковой с точностью $\pm 0.5^\circ\text{C}$.

Для оценки динамики роста регенерационной почки (бластемы) использовали метод прижизненной морфометрии планарий [9]. В качестве количественного критерия роста использовали индекс регенерации $R = s/S$, где s - площадь бластемы, S - площадь всего тела регенеранта. Каждое из измеряемых значений R - результат усреднения измерений по 30 животным. Изменение индекса регенерации в эксперименте ($R_{\text{э}}$) по сравнению с контролем

($R_{\text{к}}$) определялась по формуле:
$$\Delta R = \frac{(R_{\text{э}} - R_{\text{к}}) \pm (\delta_{\text{э}} + \delta_{\text{к}})}{R_{\text{к}}} 100\%$$
 - где ΔR - разница (%) между величинами $R_{\text{э}}$ и $R_{\text{к}}$, $\delta_{\text{э,к}}$ - стандартные ошибки измерений в опыте и контроле. Стандартная ошибка ΔR не превышала 6%.

Статистическую обработку результатов проводили программы с помощью "Sigma-Plot 9.01".



Рис. 1. Планария *Schmidtea mediterranea*. А) – интактная, Б) – регенерирующая. б – бластема (новая, непигментированная ткань).

Для облучения НТАП планарии непосредственно после декапитации помещали в чашки Петри диаметром 3 см под слой прудовой воды толщиной 1 мм. Далее чашки с планариями экспонировали 2 и 5 мин в потоке аргона (плацебо 1 и 2 группа). Две чашки экспонировали в течении 2 и 5 мин в потоке НТАП (опытные группы 1 и 2). Одна группа планарий не подвергалась никаким воздействиям (контрольная группа). Планарий облучали НТАП в

двух сериях, отличающихся различным расположением излучателя – на расстоянии 2,5 см и 4 см от поверхности чашки Петри.

Результаты и обсуждение.

В первой серии экспериментов планарий облучали потоком аргона и потоком НТАП с расстояния 2,5 см от поверхности чашки Петри. В данном случае площадь бластемы в группах плацебо не отличалась от контрольной группы планарий. После облучения НТАП в течение 2 мин погибло две планарии, а у оставшихся после 3-х дней регенерации площадь бластемы была на $12\% \pm 5,9\%$ больше площади бластемы контрольной группы планарий. В опытной группе после 5 мин облучения НТАП все животные погибли непосредственно после воздействия, по-видимому, из-за значительного нагревания чашки Петри (температура достигала 40°C). В случае нагрева воды до температуры 26°C после 2-х минутного облучения планарий НТАП наблюдалась стимуляция регенерации плоских червей (рис. 2, Таблица 1).

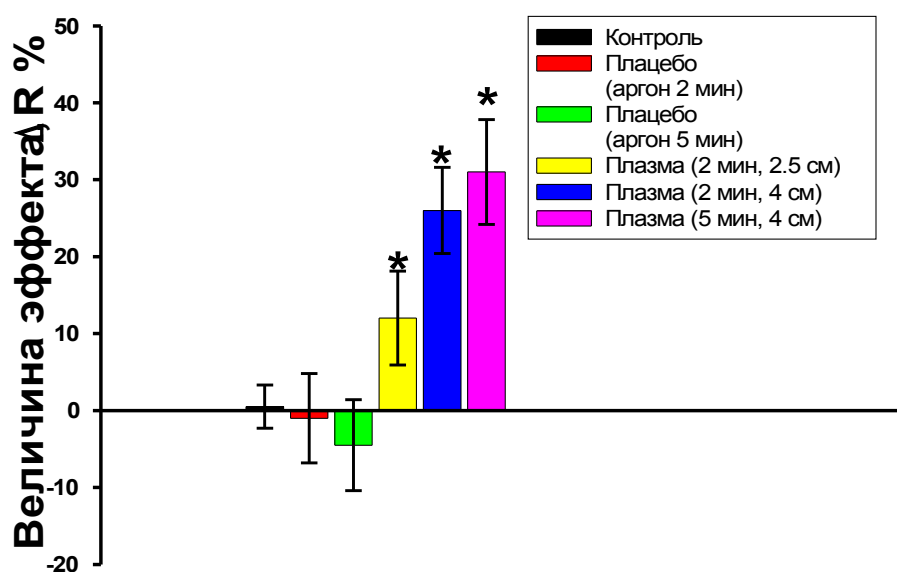


Рис. 2. Стимуляция регенерации планарий после облучения низкотемпературной аргонной плазмой по сравнению с уровнем регенерации в контроле (условия описаны в тексте).

* - $p < 0,001$

В связи с тем, что планарии живут в температурном диапазоне $19-20^{\circ}\text{C}$, а поток НТАП приводил к нагреву воды, в которой находились планарии, до $36-40^{\circ}\text{C}$, нами была проведена серия экспериментов по оценке предельно допустимой температуры нагрева

популяции регенерирующих планарий. В результате было установлено, что уже при 28°C наблюдалась 100% гибель планарий. Поэтому в последующих экспериментах было увеличено расстояние между источником плазмы и объектом с 2,5 см до 4 см для того, чтобы предотвратить нагревание поверхности воды с планариями.

В подопытной группе планарий 2-х минутное облучение животных НТАП на расстоянии 4 см от чашки с животными сопровождалось последующей стимуляцией регенерации на $26\% \pm 5,6\%$. После 5-минутного облучения планарий холодной плазмой приводило к стимуляции регенерации на $31\% \pm 6,8\%$ (рис. 2, Таблица 1).

Как известно, процессы регенерации планарий включают в себя пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток – необластов [10]. Поэтому, можно заключить, что в результате воздействия выбранных режимов НТАП на регенерирующих планарий наблюдалась стимуляция пролиферативных процессов в тканях этих животных. В конечном итоге это зафиксировано в стимулировании роста головной бластемы. Таким образом, на классической биологической модели – регенерирующих планариях удалось показать, что некоторые режимы воздействия на животных НТАП способны стимулировать пролиферацию и, очевидно, дифференцировку стволовых клеток и рост исходно поврежденных тканей *in vivo*.

Таблица 1.

Абсолютные значения величины индекса регенерации планарий в экспериментальных и контрольных группах.

Группы планарий	R $\pm$ Std.err.
Контроль (n=30)	0,0244 $\pm$ 0,00064
Плацебо (поток аргона 2 мин), (n=30)	0,0241 $\pm$ 0,00077
Плацебо (поток аргона 5 мин), (n=30)	0,0233 $\pm$ 0,00079
Плазма 2 мин 2,5 см, (n=30)	0,0273 $\pm$ 0,00086
Плазма 2 мин 4 см, (n=30)	0,0308 $\pm$ 0,00072
Плазма 5 мин 4 см, (n=30)	0,0319 $\pm$ 0,00102

Вывод: Обнаружены режимы кратковременного облучения низкотемпературной аргонной плазмой регенерирующих планарий, которые способствуют стимуляции регенерации головного конца тела животного.

Исследование выполнено по проекту изучения биологических эффектов НТАП, инициированному профессором G. Morfill (The Max-Planck Institut für extraterrestrische

Physik, Ringberg, Germany); поддержано Министерством образования и науки РФ в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы», госконтракт № 02.512.12.2023; и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, госконтракт № 16.740.11.0191.

Литература:

1. Fridman G., Shekhter A.B., Vasilets V.N., Friedman G., Gutsol A., Fridman A. Applied plasma medicine. Plasma Process. Polym, 2008, V. 5, P. 503–533.
2. Ben Gadri R., Roth J.R., Montie T.C., Kelly-Wintenberg K., Tsai P.P.Y, Helfrich D.J., Feldman P., Sherman D.M., Karakaya F., Chen Z.Y. Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP). Surf. Coat. Technol, 2000, V. 131, P. 528–542.
3. Stoffels E., Kieft I., Sladek R., Bedem L., Laan E., Steinbuch M. 2006 Plasma needle for in vivo medical treatment: recent developments and perspectives. Plasma Sources Sci. Technol, V. 15, P. 169.
4. Fridman G., Peddinghaus M., Ayan H., Fridman A., Balasubramanian M., Gutsol A., Brooks A. Friedman G. Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. Plasma Chem. Plasma Process, 2006, V. 26, P. 425–442.
5. Ermolaeva S., Varfolomeev A., Chernukha M., Yurov D., Vasiliev M., Kaminskaya A., Moisenovich M., et al. Bactericidal effects of nonthermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. J. Med. Microbiol, 2010, V. 9 [Epub ahead of print].
6. Ермакова О.Н., Ермаков А.М., Тирас Х.П. Влияние мелатонина на регенерацию планарий *Girardia tigrina*. Онтогенез, 2009, №6, С. 466-469
7. Ермакова О.Н., Ермаков А.М., Тирас Х.П. Ретиноевая кислота – как регулятор морфогенеза планарий. Онтогенез. 2009, №6, С. 449-455.
8. Sánchez Alvarado A. Planarian regeneration: Its end is its beginning. Cell, 2006, V. 124, P. 241–245.
9. Тирас Х.П., Сребницкая Л.К., Ильясова Е.Н., Леднев В.В. Влияние слабого комбинированного магнитного поля на скорость регенерации планарий *Dugesia tigrina*. Биофизика, 1996, Т. 40(4), С. 826-831.

10. Sánchez Alvarado A., Kang H. Multicellularity, stem cells, and the neoblasts of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Exp. Cell Res*, 2005, V. 306, P. 299–308.