

**ОБЛУЧЕНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ АРГОНОВОЙ ПЛАЗМОЙ МОЖЕТ
СТИМУЛИРОВАТЬ ИЛИ ТОРМОЗИТЬ РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЛАНАРИЙ**

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

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

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

E-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Резюме. Исследованы различные режимы воздействия низкотемпературной аргоновой плазмы на регенерирующих планарий с целью оптимизации обнаруженных биологических эффектов. Показано, что уменьшение «дозы облучения» приводило вместо повреждения к стимуляции регенеративных процессов, интенсивность которых зависела от продолжительности воздействия, расстояния, с которого производилось облучение, а также от физиологического состояния регенерирующих животных. Так, облучение планарий непосредственно после декапитации в течение 10 мин с расстояния 8 см сопровождалось максимальной стимуляцией скорости регенерации головного конца тела планарий. Такой же режим облучения планарий, но через несколько часов после декапитации, напротив, тормозил регенеративные процессы. Следовательно, величина и направленность ответной биологической реакции на воздействие низкотемпературной аргоновой плазмы напрямую зависит от режимов облучения и физиологического состояния животного.

Ключевые слова: низкотемпературная аргоновая плазма, режимы облучения, регенерация, планарии.

LOW-TEMPERATURE ARGON PLASMA IRRADIATION CAN STIMULATE OR INHIBIT THE 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 have revealed an activation of a planarian regeneration instead of their damage under the beam of low-temperature argon plasma. It was found an optimal conditions for the stimulation of the regenerative process, which are dependent on a duration of plasma action and a distance between the plasma generator and biological objects as well as a physiological state of animal. The irradiation of planarians immediately after their decapitation during 10 min with the distance of 8 cm activated planarian regeneration rate. The same irradiation of planarian in several hours after decapitation induced an inhibition of the regeneration process. Thus, the biological response after the low-temperature argon plasma irradiation is due to the regime of irradiation and the physiological state of animal.

Keywords: low-temperature argon plasma, conditions irradiation, regeneration, planarian.

Введение. Исходно воздействие низкотемпературной аргоновой плазмы (НТАП) предназначалось для уничтожения микроорганизмов в инфицированных ранах при минимизации повреждения клеток тканей самой раневой поверхности. Тщательный анализ результатов воздействия НТАП при изменении режимов облучения выявил, как минимум, три порога в ответной реакции клеток тканей животных: а) при обработке низкой дозой плазмы все клетки выживают, б) средняя доза ведет к гибели части клеток, и при этом наблюдается терапевтический эффект в виде стерилизации (бактерицидное действие), в) высокая доза облучения НТАП может привести к гибели и микробных, и животных клеток [1].

Обработка потоком НТАП крови приводит к ее быстрой коагуляции за счет испарения воды или локального нагрева, однако, существуют режимы облучения, при

которых не только не происходит нагрева, но и не наблюдается испарения воды [2, 3]. При этом после плазменного воздействия интенсивность коагуляции нативной и консервированной с помощью лимоннокислого натрия крови, а также крови, взятой у больных с гемофилией А, заметно отличается. Возможно, это связано со способностью НТАП вызывать активацию альтернативных каскадов свертывания крови [4, 5].

Известно, что облученные «холодной» плазмой раковых клеток кожи первой пороговой дозой, не вызывающей гибели клеток, приводило к остановке пролиферации. Через 24 часа после облучения эти клетки подвергались апоптозу. Другим доказательством способности НТАП модулировать биологические эффекты являются биологические эффекты на уровне изолированных В лимфоцитов, для которых критическим вторичным мессенджером являются ионы кальция, высвобождающиеся из внутриклеточных депо при взаимодействии антигена с рецептором на поверхности клетки. Активация данного рецептора запускает также продукцию лимфоцитами активных форм кислорода. Обработка плазмой способна стимулировать выход кальция из депо при активации клетки антигеном [3].

НТАП оказывает воздействие не только на рецепторные процессы, но и на активность ряда ферментов. Так активность трипсина падала на 50 % после облучения плазменного облучения в дозе 1 Дж/см², тогда как при дозе 4 Дж/см² трипсин полностью утрачивал свою активность. Причем денатурация трипсина происходила существенно при большей дозе облучения порядка 20 Дж/см². Вероятно, в низких дозах облучение плазмой изменялась третичная структура белка, что сказывается лишь на его активности [6].

В наших исследованиях минимизация воздействия НТАП привела к обнаружению стимуляции регенераторных процессов на уровне целостного организма [7]. Возможно, НТАП оказывает воздействие на биологические процессы посредством включения широкого спектра механизмов, описанных в современной радиобиологии, клеточной и молекулярной биологии. Однако вероятность селективного, «точечного» влияния НТАП на строго определенные клеточные процессы никем не выяснена. Возможность реализации подобного воздействия представляет интерес для многих фундаментальных и прикладных областей биологии и медицины.

Цель данного исследования заключалась в изучении некоторых режимов облучения низкотемпературной аргоновой плазмой для оценки возможности оптимизации

регенерации органов и тканей пресноводных плоских червей планарий, представляющих классический объект для изучения регенерации на уровне целостного животного.

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 профессора Gregora Morfilla из 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 и температуре 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) составляла 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).

Работа выполнена на планариях *Schmidtea mediterranea* (*Platyhelminthes*, *Triclada*) 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. При отсутствии повреждающих воздействий после подобной операции всегда происходит полное восстановление головной части планарий за 10 дней. Такая уникальная способность к регенерации обусловлена наличием до 20% необластов (стволовых клеток) среди общей клеточной массы в теле планарий [8]. Регенерирующие планарии после воздействия потока аргона без облучения (плацебо) и холодной аргоновой плазмы помещались в стеклянные стаканы (по 30 особей на стакан), содержащие по 20 мл прудовой воды. Температура воды (22 °C) в экспериментальном и контрольном стаканах поддерживалась одинаковой с точностью ±0,5°C.

Для оценки динамики роста регенерационной «почки» (бластемы) использовали метод прижизненной морфометрии планарий путем регистрации фотоконтраста между

старыми (пигментированными) и новыми (прозрачными) частями тела. Молодая формирующаяся бластема поначалу не покрыта пигментным эпителием, что позволяет четко выделить ее область на фоне пигментированной остаточной старой части тела [9, 10, 11]. Стандартные изображения регенерирующих планарий получали и отцифровывали с помощью автоматизированного комплекса, включающего цифровую видеокамеру DCM 300, смонтированную на окуляре бинокулярного микроскопа МБС-10, и компьютера IBM PC. С помощью оригинального пакета программ Plana 4.4, разработанного А. А. Деевым (ИТЭБ РАН), определялась общая площадь тела животного и площадь бластемы.

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 плацебо-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 среднего для ΔR не превышала 6%. Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью программы "Sigma-Plot 9.01".

Интактных или регенерирующих планарий (непосредственно после декапитации) помещали в чашки Петри диаметром 3 см и облучали НТАП через слой прудовой воды толщиной 1 мм. Параметры экспозиций были следующими:

1) Для определения роли расстояния от источника НТАП до облучаемого объекта и длительности облучения на процесс регенерации процедуру обработки НТАП выполняли непосредственно после декапитации при удалении выходной апертуры генератора на расстояния 4, 6, 8 или 10 см при продолжительности облучения 5, 10 или 15 мин.

2) Облучения планарий до операции декапитации, запускающей процесс регенерации: декапитацию производили через 4, 6, или 24 часа после облучения животных НТАП.

3) Серия отсроченного облучения планарий после декапитации, спустя 1, 4, 6 или 24 часа после запуска регенерации.

Результаты и обсуждения

При воздействии НТАП на планарий непосредственно после декапитации (Серия 1) в течение 5 мин при расстоянии между облучателем и планариями 4, 6, 8 или 10 см наблюдался стимулирующий эффект, который составлял $31,5 \pm 6,5\%$, $29,3 \pm 7,2\%$, $36,2 \pm 6,6\%$ и $25,5 \pm 6,1\%$ соответственно (рис. 1). Облучение продолжительностью 10 мин с расстояния 4, 6, 8 или 10 см приводило к максимальной стимуляции скорости роста головной бластымы - регенерация планарий ускорялась на $44,2 \pm 6,7\%$, $51,9 \pm 6,4\%$, $54,2 \pm 6,9\%$ и $32,4 \pm 6,9\%$ (рис. 1). При этом, как и в предыдущем эксперименте, максимальные эффекты наблюдались при облучении с расстояния 8 см, тогда как его увеличение до 10 см приводило к снижению величины эффекта.

Увеличение длительности облучения планарий до 15 мин приводило к разнонаправленным эффектам в зависимости от расстояния между излучателем и объектом. Так, при 4 см еще наблюдалась стимуляция скорости роста головной бластымы на $22,1 \pm 5,9\%$, тогда как при последующем увеличении расстояния до 6 см стимулирующий эффект исчезал, а при 8 см регенерация тормозилась на $14,9 \pm 7,0\%$. Облучение регенерирующих планарий в течение 15 мин и на расстоянии 10 см не оказывало сколько-нибудь значимого воздействия на регенерацию (рис. 1).

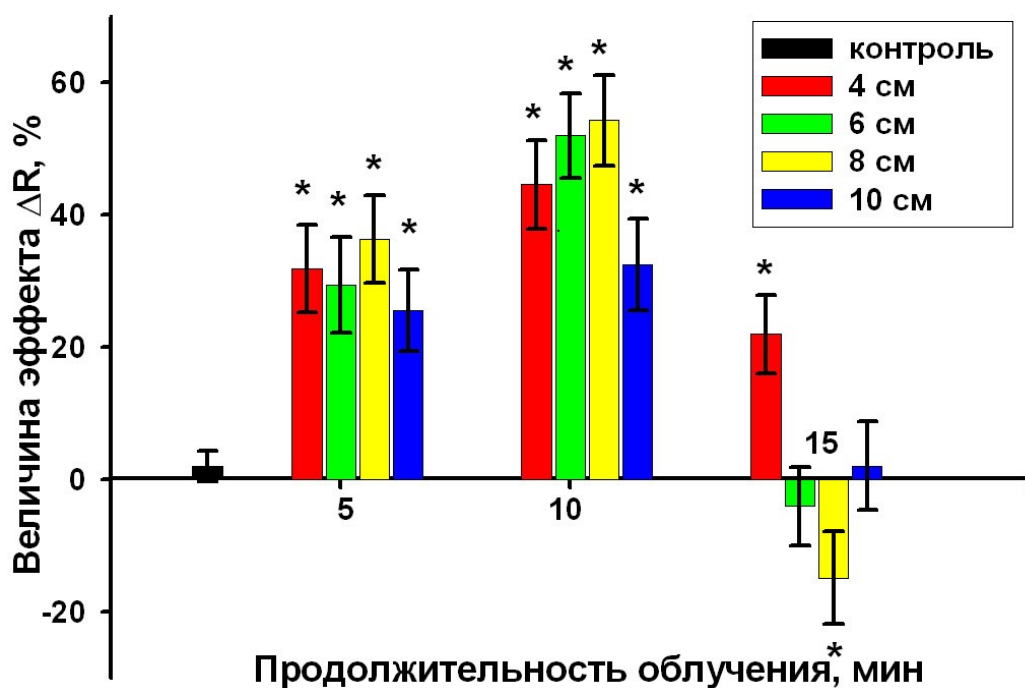


Рис. 1. Уровень стимуляции регенерации планарий при 5, 10 и 15 минутном облучении НТАП непосредственно после декапитации в зависимости от расстояния между

плазмогенератором и объектом. $*p < 0,001$.

Изменение ответной реакции процесса регенерации головного конца планарий на воздействие НТАП в зависимости от продолжительности облучения и расстояния до облучаемого объекта, может быть, обусловлено изменением соотношения действующих компонентов. Иными словами, это, по-видимому, обусловлено разными влияниями изменения физических свойств смеси плазмы с воздухом, затрагиванием разных механизмов и мишеней. Одной из первых мишеней могут быть молекулы воздуха, при взаимодействии с которыми возможно образование свободных радикалов кислорода и азота, с последующим их взаимодействием с биологическими системами [12, 13]. Другой мишенью могут быть молекулы воды, покрывающей планарии. Не исключено, что плазма приводит к частичному радиолизу воды, продукты которого могут воздействовать на живые организмы. И конечно, меняется влияние и взаимодействие и вновь образованных радикалов и заряженных плазменных частиц непосредственно с объектом облучения. При этом нельзя исключать влияние на биологические процессы и других физико – химических факторов, таких как ультрафиолетовое и инфракрасное излучение, СВЧ излучение, формирование поверхностных зарядов. Перечисленные выше варианты могут быть не полны и в каждом случае их вклад меняется при различных режимах облучения. Так, увеличение расстояния от источника до объекта облучения и продолжительности облучения, видимо, способно приводить к такому соотношению продуктов взаимодействия плазмы с воздухом, которые при попадании в воду вызывают ингибирование регенерации у планарий. Небольшое уменьшение расстояния пролета заряженных частиц и продолжительности облучения приводит к изменению состава продуктов реакции «плазма – воздух – вода», которые вызывают максимальную стимуляцию регенеративных процессов. Помимо этого, уменьшение расстояния от источника до объекта может приводить к тому, что заряженные частицы плазмы способны взаимодействовать и с молекулами воды, находящимися в среде. Поэтому, изменяя продолжительность облучения и расстояние пролета заряженных частиц плазмы, мы изменяем соотношение продуктов взаимодействия между системами «плазма – воздух», «плазма – вода» и «плазма – воздух – вода». Эти изменения приводят к аддитивным синергичным или антагонистичным эффектам при взаимодействии с различными рецепторными и внутриклеточными сигнальными системами стволовых клеток планарий, выражающиеся в изменении скорости регенеративных процессов.

Для проведения экспериментов по предоблучению и постоблучению планарий НТАП (Серия 2 и 3) нами был выбран режим, приводящий к проявлению максимальной стимуляции регенерации с Серии 1 (непосредственно после декапитации): расстояние от излучателя до объекта 8 см и продолжительность облучения 10 мин.

Предоблучение планарий за 1, 4, 6 часов до запуска регенерации путем декапитации (Серия 2) приводило к достоверной стимуляции роста головной бластемы на $11 \pm 5,3\%$, $29,4 \pm 6,2\%$ и $27,4 \pm 5,7\%$ (рис. 2). Однако увеличение срока между предварительным облучением до 24 часов перед декапитацией приводило лишь к значимому ингибированию роста бластемы на $20,1 \pm 6,4\%$.

Облучение планарий после декапитации (Серия 3) не вызывало позитивных эффектов или приводило к ингибированию регенерации. При этом скорость регенерации у планарий, облученных через 4 часа после декапитации, не отличалась от контрольной (рис. 2). Тогда как у планарий, регенерация которых активировалась за 6 часов перед облучением, наблюдалось достоверное снижение индекса регенерации на $10,7 \pm 5,7\%$. А если облучение проводили через 24 часа после активации регенерации, то рост бластемы у подопытных групп замедлялся на $20 \pm 6,6\%$ по сравнению с контрольными (рис. 2).

Обнаруженные закономерности воздействия НТАП на регенерацию планарий могут быть обусловлены и особенностями физиологического состояния животных. В основе данных процессов лежат биохимические и молекулярно-биологические механизмы управления пролиферацией и дифференцировкой стволовых клеток – необластов. Отсрочка времени декапитации от облучения, возможно, приводит к биохимической деградации сигнальных мессенджеров, которые выделяются в ответ на воздействия плазмы и инициируют стимуляцию регенерации. В итоге мы наблюдаем даже более низкие значения индекса регенерации у подопытных групп по сравнению с контрольными. В опытах с декапитацией после облучения проявляются аналогичные явления, хотя и при декапитации через 1, 4 и 6 часов мы наблюдаем стимулирование регенерации, которое, неизбежно, связано с активацией стволовых клеток в теле планарий, но при запуске регенерации через 24 часа после облучения рост бластемы замедлен. Это легко связывается с истощением и биохимической деградацией сигнальных молекул, которые контролируют уровень пролиферации стволовых клеток планарий.

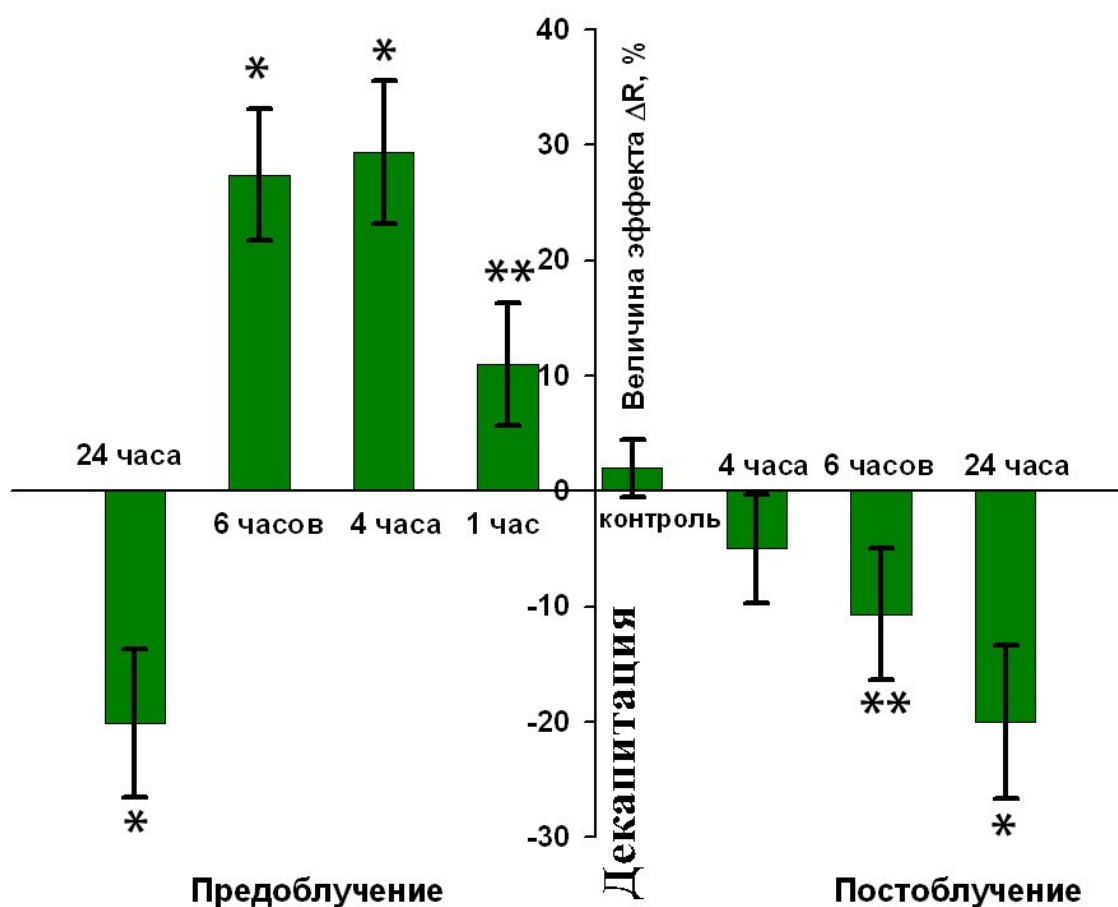


Рис. 2. Уровень изменения скорости регенерации планарий при облучении НТАП планарий перед и после декапитации. Параметры облучения: расстояние излучателя плазмы до объекта 8 см, продолжительность облучения 10 мин. Часы – время декапитации до и после облучения плазмой. * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Выводы:

1. Обнаружена возможность контроля интенсивности регенерации планарий посредством изменения режимов облучения низкотемпературной аргоновой плазмой: от стимуляции регенерации до ее ингибирования.
2. Сеансы облучения регенерирующих планарий непосредственно после декапитации, сопровождаются максимальным приростом интенсивности регенеративных процессов.
3. Обнаружена зависимость ответной реакции животных на влияние одних и тех же режимов НТАП от физиологического состояния животных, в частности через 4 часа после запуска регенерации облучение вместо стимуляции вызывает ингибирование роста головной бластемы.

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 ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы», госконтракт № 16.740.11.0191.

Литература:

1. Fridman G., Brooks A.D., Balasubramanian M., Fridman A., Gutsol A., Vasilets V.N., Ayan H. and Friedman G. (2007) Comparison of direct and indirect effects of non-thermal atmospheric pressure plasma on bacteria Plasma Process. Polym. 4 P. 370–5.
2. Ginsberg G.G., Barkun A.N., Bosco J.J., Burdick J.S., Isenberg G.A., Nakao N.L., Petersen B.T., Silverman W.B., Slivka A. and Kelsey P.B. (2002) The argon plasma coagulator Gastrointest. Endosc. 55 P. 807–10.
3. Dobrynin D. et al. (2007) Mechanisms of plasma interaction with living tissue Drexel University Research Day (Philadelphia, USA).
4. Kalghatgi S. et al. (2007) Applications of non-thermal atmospheric pressure plasma in medicine NATO Advanced Study Institute on Plasma Assisted Decontamination of Biological and Chemical Agents (Cesme-Izmir, Turkey: Springer).
5. Fridman G., Shekhter A.B., Vasilets V.N., Friedman G., Gutsol A., Fridman A. (2008) Applied plasma medicine. Plasma Process. Polym, V. 5, P. 503–533.
6. Fridman G., Li M.Y., Lelkes P.I., Friedman G., Fridman A. and Gutsol A.F. (2005) Nonthermal plasma bio-active liquid micro and nano-xerography IEEE Trans. Plasma Sci. 33 P. 1061–5.
7. Ермаков А.М., Ермакова О.Н., Маевский Е.И., Васильев М.М., Петров О.Ф., Фортов В.Е. (2010) Влияние низкотемпературной аргонной плазмы на скорость регенерации планарий. Интернет издание www.medline.ru 11: 160-167.
8. Ermakov A.M., Ermakova O.N., Kudravnits A.A., Kreshchenko N.D. (2011) Study of planarian stem cell proliferation by means of flow cytometry. Mol Biol Rep. DOI 10.1007/s11033-011-1070-1

9. Тирас Х.П., Сахарова Н.Ю. (1984) Прижизненная морфометрия планарий. Онтогенез 15(1): 42-48.
10. Тирас Х.П., Хачко В.И. (1990) Критерии и стадии регенерации в планариях. Онтогенез 21(6): 620-624.
11. Тирас Х.П., Сребницкая Л.К., Ильясова Е.Н., Леднев В.В. (1996) Влияние слабого комбинированного магнитного поля на скорость регенерации планарий *Dugesia tigrina*. Биофизика 40(4): 826-831.
12. Wiseman H. and Halliwell B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer Biochem. J. 313 P. 17-29.
13. Riley P.A. (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation Int. J. Radiat. Biol. 65 P. 27-33.