

Активация регенерации планарий низкотемпературной аргонной плазмой, генерируемой плазменным скальпелем.

Ермаков А.М.¹, Ермакова О.Н.¹, Маевский Е.И.¹, Лаженицын А.И.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, 142290, Московская обл., г.

Пушино, ул. Институтская, д.3.

²НПЦ Плазменных технологий, 117049, г. Москва, ул. Крымский Вал, д.3, стр. 1.

E-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Activation of planarian regeneration by low-temperature argon plasma generated in a plasma scalpel.

Ermakov A.M.¹, Ermakova O.N.¹, Maevsky E.I.¹, Lagenizin A.I.²

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian academy of sciences. Russia 142290, Moscow region, Pushchino, Ul Instititskaya.3.

²RTC Plasma technology. Russia. 117049, Moscow, Ul. Krymsky Val.3, build. 1.

E-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Резюме:

Обнаружены условия, при которых облучение аргонной плазмой, генерируемой плазменным скальпелем, способно активировать регенеративные процессы у животных - пресноводных плоских червей планарий. На увеличенном расстоянии между соплом плазменного генератора и объектом удалось полностью исключить тепловое повреждение тканей планарий и выбрать режим, обеспечивающий максимальный стимулирующий регенерацию животных эффект. Максимальную стимуляцию регенерации головного конца тела планарий наблюдали при облучении в течение 5 мин на расстоянии 25 см от сопла. Продемонстрирована возможность широкого применения плазменного скальпеля-коагулятора в терапевтических целях.

Summary:

We have revealed conditions for stimulation of animal regeneration (in the example of freshwater flatworms planarian) by argon plasma radiation which was generated in a plasma scalpel. Locating flatworms at the longer distance from the plasma torch allowed us to exclude temperature destruction of planarian tissues and to choose a mode providing highest

regeneration-stimulating effect. Maximal stimulation of planarian cephalic end regeneration has been observed under plasma irradiation during 5 min at 25 cm from the plasma torch. Thereby we demonstrated the possibility of broad application of plasma scalpel for therapeutic aims.

Ключевые слова: планарии, регенерация, плазменный скальпель, аргоновая газовая плазма.

Key words: planarians, regeneration, plasma scalpel, argon gas plasma.

Введение.

Одним из первых опытов практического применения газовой плазмы (ГП) в биологии, экологии и медицине стало использование плазмы как агента, разрушающего биологические объекты и структуры. Так появились плазменная хирургия и методы плазменной стерилизации медицинского инструментария. В целом для плазменной хирургии широко стали применять плазменные скальпели, где с помощью высокотемпературной плазменной струи (с температурой порядка 10000⁰С) производят рассечение и спекание тканей [1, 2]. Опыт применения плазменных скальпелей хирургами показывает, что газовая плазма способна не только к деструкции биоткани, но и способна эффективно стерилизовать обрабатываемую поверхность (при минимизации температурного фактора). Внедрение в медицинскую практику метода стерилизации, основанного на использовании ГП, оказалось весьма перспективно, поскольку позволяет стерилизовать самые разнообразные материалы, в том числе полимеры, которые требуют щадящих (нетермических), быстрых, безопасных и дешёвых способов стерилизации [3 – 5].

Помимо стерилизующего эффекта было обнаружено, что обработанные потоком охлажденной ГП раны показывают большую скорость заживления, чем не обработанные. Данный эффект возможно связан не только со снижением микробной нагрузки на рану, но и активацией плазмой регенеративного и иммунного ответа клеток и тканей [6]. Данное предположение нами было проверено ранее на примере пресноводных плоских червей планарий. С помощью данного модельного биологического объекта нами было обнаружено, что низкотемпературная аргоновая плазма, при определенных режимах облучения способна значительно стимулировать регенеративные процессы у данных животных [7, 8]. В данной работе нами использовался широкоапертурный СВЧ генератор низкотемпературной аргоновой плазмы MicroPlaSter β, и в связи с этим у нас возник вопрос – возможно ли воспроизведение полученных эффектов биологической активности

газовой плазмы, генерируемой с помощью плазменного скальпеля? Таким образом, **цель данного исследования** – поиск режимов облучения аргоновой плазмой, создаваемой плазменным скальпелем, обеспечивающих стимуляцию регенеративных процессов у планарий.

Материалы и методы.

В качестве генератора аргоновой плазмы использовали плазменный скальпель, созданный отечественной фирмой НПЦ «Плазменных технологий» (рис. 1 а, б). Для исследований использовали аргон высокой чистоты. Скорость потока газа составляла 2 л/мин, при этом плазменная струя создавалась при 50% мощности прибора. Плазменная горелка закреплялась в стационарном штативе для обеспечения регулирования расстояния от излучателя до облучаемого объекта (рис. 2 а, б). Температура газовой плазмы при выходе из сопла горелки составляла порядка 10000 °С, при этом уже на расстоянии 10 см плазма охлаждалась до температуры порядка 40 °С, т.е. уже была типичной низкотемпературной аргоновой плазмой.



а

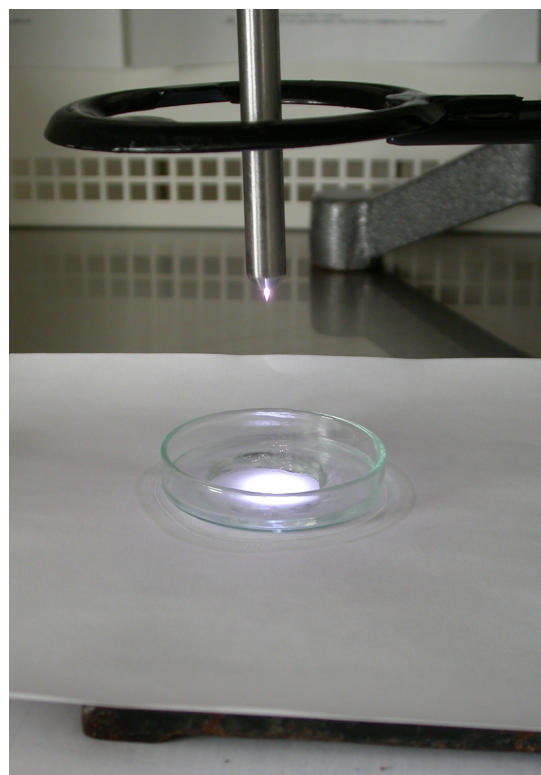


б

Рис. 1. Плазменный скальпель производства НПЦ «Плазменных технологий» (Россия): а – внешний вид, б – плазменная горелка.



а



б

Рис. 2. Работа с плазменной горелкой: а – горелка, закрепленная в штативе, б – облучение планарий в чешке Петри газовой плазмой.

Работа выполнена на планариях *Schmidtea mediterranea* (Platyhelminthes, Triclada) бесполой лабораторной расе плоских червей (рис. 3). 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 аргоновой 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 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.



Рис. 3. Планария *Schmidtea mediterranea*

Для оценки динамики роста регенерационной почки (бластемы) использовали метод прижизненной морфометрии планарий. Метод базируется на регистрации фотоконтраста между старыми (пигментированными) и новыми (прозрачными) частями тела. Молодая формирующаяся бластема в первые дни 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 с помощью 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 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%.

Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью программы "Sigma-Plot 11" с использованием критерия Стьюдента.

Для облучения аргоновой плазмой интактных, или регенерирующих планарий непосредственно после декапитации помещали в чашки Петри диаметром 3 см под слой прудовой воды толщиной 5 мм. Облучение животных проводили с расстояний 8, 12, 15, 20 и 25 см. Продолжительность облучения в каждом случае составляла 2, 5 и 10 мин.

Результаты и обсуждения

В первой серии экспериментов мы пытались минимизировать температурную оставляющую биологического эффекта. Для этого было выбрано первое минимально - возможное расстояние облучения – 8 см и продолжительностью 2 мин. Данный режим приводил к нагреву воды с планариями до 28 °С и последующей гибели как интактных, так и регенерирующих животных, так как они не выносят высоких температур (оптимальная температура воды для *S. mediterranea* составляет 20 – 22 °С).

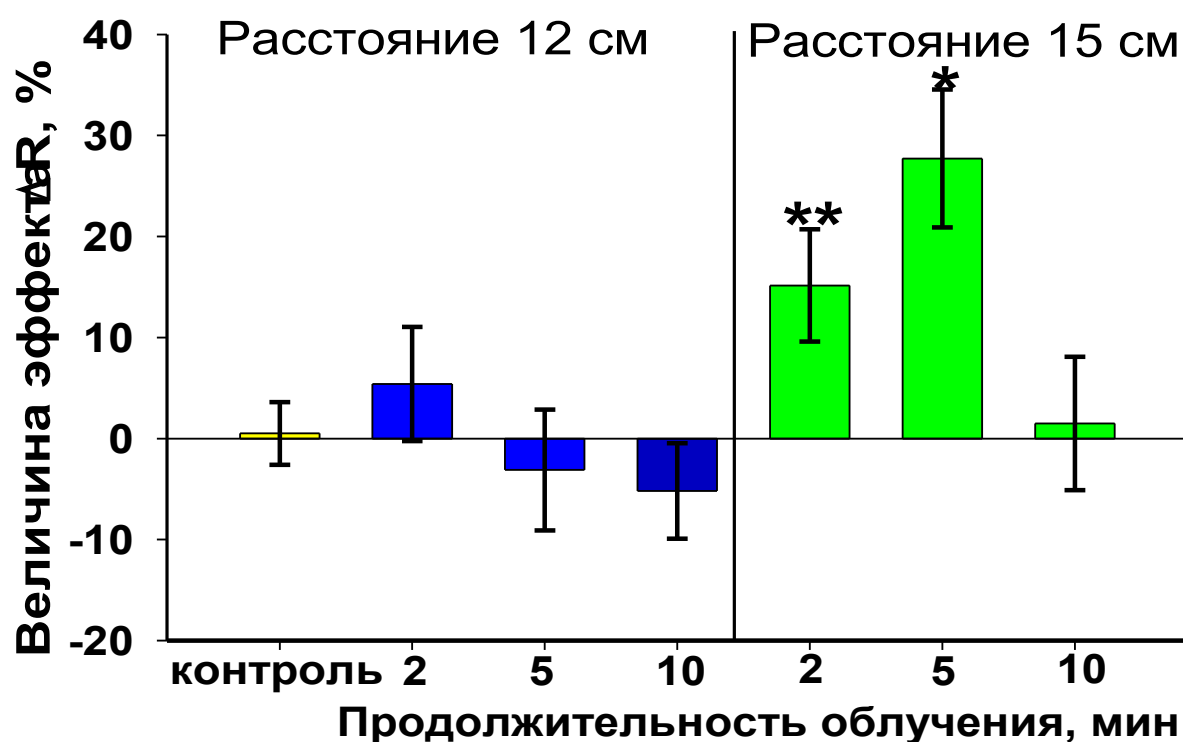
В следующей серии экспериментов мы увеличили расстояние сопла скальпеля - объект до 12 см. Данный режим, при продолжительности облучения 2, 5 и 10 мин, не обеспечивал нагрева воды (температура менялась не более чем на 1 °С), не вызывал гибели интактных планарий. Также он и не приводил к изменению скорости регенерации головного конца тела животных (рис.4). Напротив, увеличение данного расстояния до 15 см. приводило к тому, что уже при 2 минутном воздействии аргоновой плазмы на регенерирующих планарий мы наблюдали ускорение процесса регенерации головы животных до 15 %. Увеличение продолжительности облучения до 5 мин приводило к стимуляции роста бластемы на 28%, тогда как при 10 минутной экспозиции достоверного биологического эффекта не наблюдалось (рис. 4).

Дальнейшее увеличение расстояния между источником аргоновой плазмы и объектом облучения показало следующее: 20 см. - эффект при продолжительности облучения 2 и 5 мин был сопоставим с эффектом, наблюдаемым на 15 см., но в отличие от последнего при 10 мин облучении в данном случае уже наблюдалось достоверное стимулирование регенерации планарий (эффект составлял 8%). При расстоянии 25 см. мы наблюдали максимальное проявление биологического эффекта, так при 2 минутном облучении эффект составлял 14%, 5 минутном – 36%, а 10 минутном – 20%.

Наблюдаемая дозозависимость эффекта воздействия аргоновой плазмы на регенерирующих планарий повторяет те эффекты, которые нами были получены ранее [8]. Вероятно, биологическая активность плазмы, генерируемой плазменным скальпелем, связана с теми же химическими факторами, что и в случае низкотемпературной аргоновой плазмы, генерируемой MicroPlaSter β. Зависимость биоэффекта от времени пролета плазменной струи в воздухе указывает на большую роль в этом процессе продуктов взаимодействия ионизированного аргона с воздухом. В частности показано, что это могут быть радикалы кислорода, азота, оксида азота и их продуктов взаимодействия с водяными парами и водой [12]. При этом величина и направленность биологической активности

газовой плазмы зависит от концентрации и состава продуктов свободнорадикальных процессов, запускаемых потоком ионизированного газа (в нашем случае аргона).

Таким образом, в не зависимости от способа получения аргоновой плазмы неизвестные продукты ее взаимодействия с живыми организмами способны существенно ускорять пролиферацию стволовых клеток планарий, и вероятно, с помощью тех же самых механизмов она стимулирует регенеративный и иммунный потенциал раневых поверхностей. Также мы показали, что высокотемпературные плазменные скальпели при небольшой модификации способа и выбора определенного режима обработки раневой поверхности могут обладать мультитерапевтическим действием.



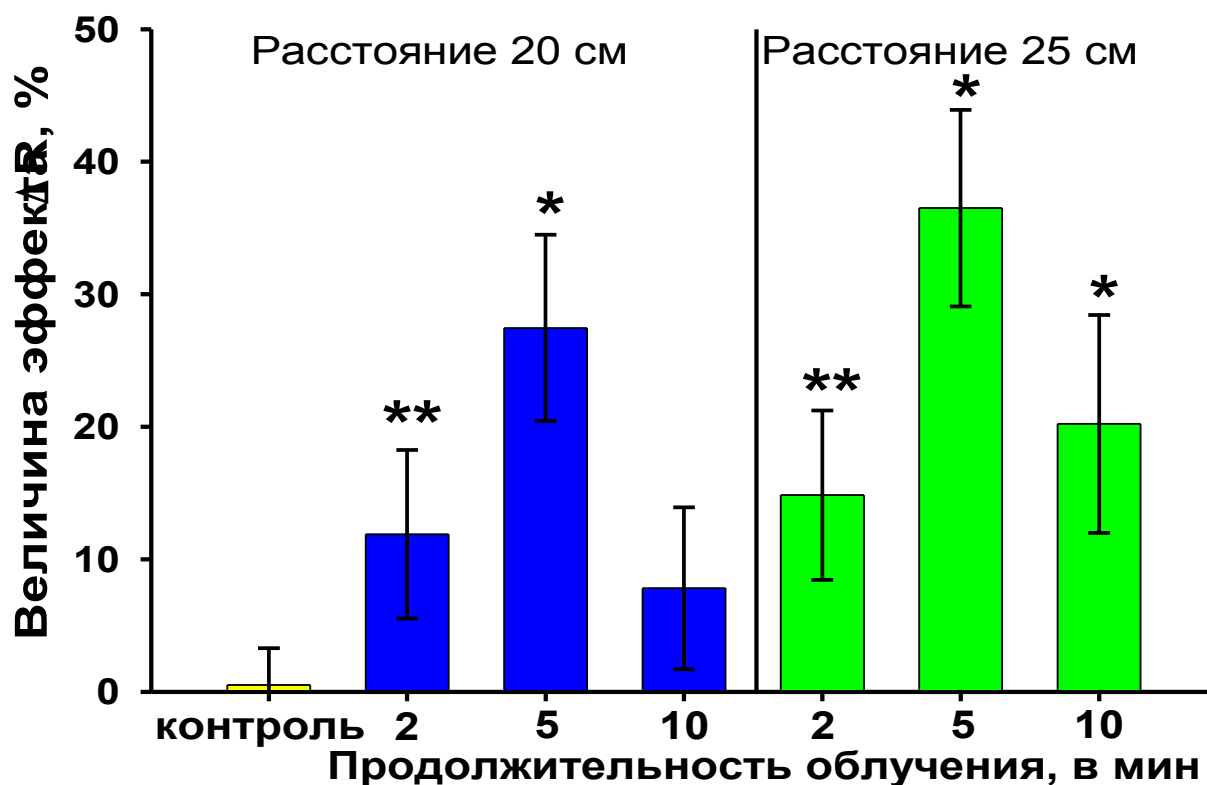


Рис. 4. Стимуляция регенерации планарий после облучения аргоновой плазмой, генерируемым плазменным скальпелем, средние представлены в виде $M \pm m$. Расстояние – расстояние между соплом плазменной горелки и чашкой Петри с планариями. ** $p < 0,05$; * $p < 0,001$

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы», госконтракт № 16.740.11.0191, а также гранта Президиума РАН ФНМ № 01201256032.

Литература

1. Kasum'ian S.A., Novikov I.G., Varchuk O.D., Bazhenov S.M., Zaitseva V.V. (1997) Application of plasma scalpel for cholecystectomy. *Khirurgiia (Mosk)*, (9): 30 - 32.
2. Shalutko A.M., Osmanov E.G., Antropova N.V., Anchikov Glu. (2006) Argon plasma flowing the complex treatment of different forms of erysipelas. *Khirurgiia (Mosk)*, (3): 59 – 62.
3. Anpilov, E. Barkhudarov, Yu. Bark et al, (2001) An electric discharge in the water-gas mixture as a source of UV radiation, ozone and hydrogen peroxide. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 34, 993-999.

4 Akishev Yu., Kroepke S., Behnisch J., Hollander A., Napartovich A., Trushkin N. (2000) Proc. Int. Symp. High Pressure Low-Temp. Plasma Chemistry (HAKONE-VII), Greifswald, Germany, Vol. 2, 481-485.

5 Yamabe C., Miichi T., Ihara S., Hayashi N., and Satoh S. (2000) Proc. XIII Int. Conf. Gas Discharges and their Applications, Glasgow, September, Vol. 2, 684-687.

6. Bogle M.A., Arndt K.A., Dover J.S. (2007) Plasma skin regeneration technology. Arch. Dermatol. 6(11): 1110-2.

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, Т.11, С. 160-167.

8. Ермаков А.М., Ермакова О.Н., Маевский Е.И., Васильев М.М., Петров О.Ф., Фортов В.Е. (2011) Облучение низкотемпературной аргонной плазмой может стимулировать или тормозить регенерацию планарий. Интернет-издание medline.ru, Т. 12, С. 948-958.

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. Vasiliev M. Low Temperature Atmospheric Argon Plasma for Medical Applications: Diagnostics and Results. Abstracts Agenda Ringberg Workshop Oct. 2011