

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ АРГОНОВОЙ ПЛАЗМЫ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЛАНАРИЙ

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

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Московская обл. г. Пущино, ул.*

Институтская д.3;

²*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки РАН, 142290, Московская обл. г. Пущино, ул. Институтская д.3*

E-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Резюме. Исследовано действие активирующего и ингибирующего режима низкотемпературной аргонной плазмы на пролиферацию стволовых клеток у интактных и регенерирующих планарий. Показано, что облучение плоских червей непосредственно после декапитации в течение 10 мин с расстояния 8 см приводит к стимуляции пролиферативной активности стволовых клеток в теле животных. Такой же режим облучения интактных планарий также приводил у них к активации митотической активности. Применение другого режима - облучение планарий в течение 20 мин с расстояния 8 см приводит к подавлению пролиферативной активности стволовых клеток в теле животных на 24 час после декапитации. Таким образом, на примере биологической модели - планариях установлено, что с помощью разных режимов воздействия низкотемпературной аргонной плазмы возможно контролировать активность стволовых клеток в условиях *in vivo*.

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

STUDY EFFECTS OF LOW TEMPERATURE ARGON PLASMA ON THE PLANARIAN STEM CELL PROLIFERATION

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

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

²*The Institute of Cell Biophysics of Russian Academy of Sciences*

Summary. Investigated of activating effect and inhibiting the mode of low-temperature argon plasma on proliferation of stem cells in intact and regenerating planarians. It is shown, that irradiation flatworms immediately after decapitation for 10 min at a distance of 8 cm leads to stimulation of the proliferative activity of stem cells in the animal body. The same mode of exposure of intact planarians also led them to activation of the mitotic activity. Applying different mode - planarians irradiation for 20 min at a distance of 8 cm to suppress the proliferative activity of stem cells in the body of animals 24 hours after decapitation. Thus, on the biological model – planarian we demonstrated, that by using different modes of low-temperature argon plasma exposure may regulate of the activity in stem cells in vivo.

Keywords: low-temperature argon plasma, exposure regimes, stem cells, proliferation, regeneration, planarian.

Введение

Низкотемпературная газовая плазма в настоящее время широко используется в качестве стерилизующего агента, способного уничтожить все виды микрофлоры, в том числе и патогенной с множественной антибиотикорезистентностью [1, 2]. Установлены режимы стерилизации, которые не повреждают структуры обрабатываемых тканей колонизированных микрофлорой [3].

Воздействие «холодной» плазмы может приводить не только к стерилизации, но и стимулировать физиологические и биохимические изменения в эукариотических клетках и целом организме [4]. Она способна подавлять пролиферацию раковых клеток, модулировать иммунный ответ, стимулировать ранозаживляющие процессы [5, 6, 7]. Все эти эффекты можно получить на фоне стерилизации путем подбора соответствующих

режимов облучения и выбора физиологического состояния при котором будет проводится обработка [6].

Ранее нами было установлено, что изменяя продолжительность и интенсивность облучения низкотемпературной аргоновой плазмой (НТАП) плоских червей планарий можно существенно ускорить или замедлить процессы регенерации их головной части [8]. При этом было выяснено, что воздействие на планарий в различных фазах регенерации одними и теми же режимами облучения НТАП можно изменять скорость роста регенерационной почки – бластемы [9].

Известно, что регенерация планарий напрямую зависит от скорости пролиферации и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток – необластов, составляющих более 20% клеток тела этого животного [10, 11]. Поэтому мы предположили, что основной мишенью действия НТАП являются необласты, от интенсивности пролиферации которых напрямую зависит скорость регенераторных процессов у планарий в целом. Поэтому целью данного исследования являлось **исследование воздействия низкотемпературной аргоновой плазмы на пролиферацию стволовых клеток планарий в условиях *in vivo***.

Материалы и методы

Животные

Работа выполнена на планариях *Schmidtea mediterranea*, бесполой лабораторной расе плоских червей (рис. 1). Планарий содержали в прудовой воде (смесь водопроводной и дистиллированной воды в пропорции 2:1) при комнатной температуре и кормили раз в неделю личинками двукрылых. Для экспериментов отбирали животных длиной около 10 мм и прекращали их кормление за 7 дней до опытов. Регенерация вызывалась ампутацией 1/5 части тела планарий, содержащей головной ганглий.



Рис. 1. Планария *Schmidtea mediterranea*. Цена деления – 1 мм

Метод облучения планарий низкотемпературной аргоновой плазмой

Для облучения плазмой интактных или регенерирующих планарий непосредственно после декапитации помещали в чашки Петри диаметром 3 см под слой прудовой воды толщиной 1 мм. Далее чашки с планариями экспонировали на расстоянии 8 см от источника плазменного излучения в течение 10 мин для достижения стимулирующего эффекта или 20 мин для ингибирующего эффекта. 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 однородными 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. Поток газовой плазмы формировался в струе плазмы использовался высокоочищенного аргона (99.998 %), протекающего через СВЧ горелку со скоростью 2.2 стандартных литров в минуту. 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.

Метод иммуногистохимии планарий

Планарий обездвигивали в течение 5 мин в 7% растворе N-ацетил цистеина и фиксировали в 4% растворе формальдегида в ФСБ + 0,3 % Triton X100 в течение 20 мин. Дальнейшие процедуры проводили согласно протоколу, описанному в работе Ньюмарка и

Альварадо [12]. Для выявления митотических клеток в теле планарий использовали первичные антитела на фосфорилированный гистон 3 (Santa Cruz, США) в разведении 1/700 и вторичные антитела с флуоресцентным красителем CF488A (Biotium, США) в разведении 1/1000. Планарий после отмывки от вторичных антител помещали в среду для иммуофлуоресценции Vectashield (Vector Labs, США) и микроскопировали с помощью конфокального микроскопа Leica Microsystems SP5 (Германия). Полученные изображения планарий обрабатывали программой ImageJ (NIH, США), с помощью которой производилось 3D моделирование морфологической и анатомической структуры планарии (рис. 2). Подсчет митотических клеток и площади животных осуществляли с помощью программы Axio Image (Carl Zeiss, Германия), далее определяли число митотических клеток на мм² площади тела животного и усредняли данное значение по измерениям у 10 животных. Изменение митотической активности необластов оценивали по методу, описанному в работе Ермаковой и др. [13].

Статистическая обработка полученных результатов

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы "Sigma-Plot 9.11" (Systat Software Inc., Германия). Для анализа данных использовали дисперсионный однофакторный анализ ANOVA.

Результаты и обсуждения

На рисунке 3 представлено исследование динамики пролиферативной активности стволовых клеток, где видно, что после декапитации у планарий наблюдается существенное увеличение числа митотических клеток в теле. Максимальная митотическая активность обнаружена через 6 часов после декапитации, далее к 8-му часу она снижалась, но к 24-му часу вновь наблюдалось увеличение числа митотических клеток. Анализ динамики пролиферативной активности у регенерирующих планарий после воздействия активирующего режима облучения НТАП выявил достоверное увеличение количества митотических клеток в некоторых точках наблюдаемого диапазона от 4 до 24 часа после декапитации. Так величина эффекта стимуляции на 4-ый час регенерации

составляла $38\% \pm 31\%$ ($p=0,277$), 6-ой час $61\% \pm 31\%$ ($p=0,037$), 8-ой час $39\% \pm 30\%$ ($p=0,390$) и на 24-ый час $76\% \pm 31\%$ ($p=0,008$).

Сравнение динамики пролиферативной активности стволовых клеток у интактных планарий в контроле и после воздействия активирующего режима НТАП показало, что у животных после облучения наблюдалась активация деления стволовых клеток по динамике, схожей с таковой у регенерирующих (рис. 4), но смещенной на несколько часов ранее. У таких животных на 2 час после облучения происходило увеличение числа митотических клеток по сравнению с контрольным уровнем на $163\% \pm 31\%$ ($p<0,001$). На 4, 6, 8 час после воздействия НТАП наблюдали постепенное снижение эффекта на $134\% \pm 50\%$ ($p<0,01$), $112\% \pm 50\%$ ($p<0,01$) и $94\% \pm 41\%$ ($p<0,01$) соответственно. Но на 24 час наблюдался 2-ой пик активации пролиферативных процессов, при этом величина эффекта составляла $181\% \pm 50\%$ ($p<0,01$).

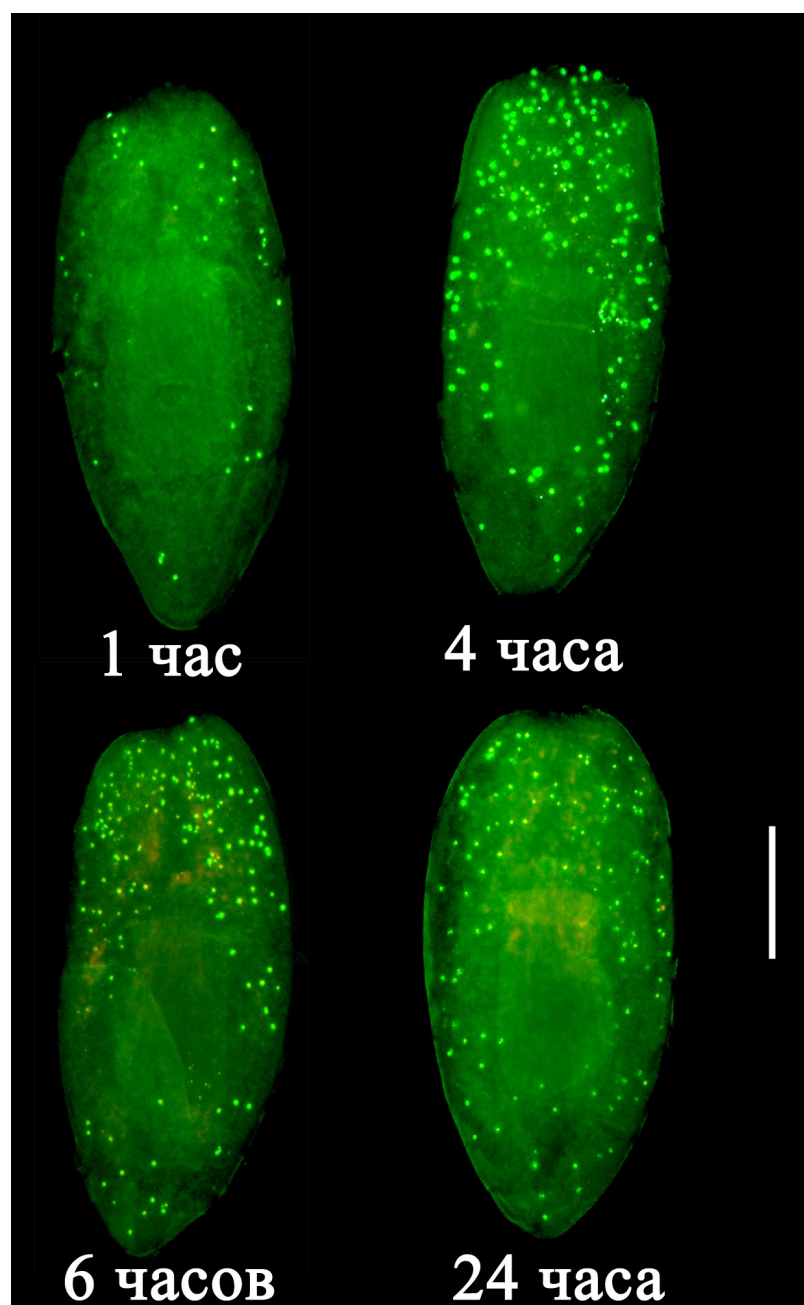


Рис. 2. Изменения митотической активности в теле планарий после декапитации. *Цена деления – 1 мм.*

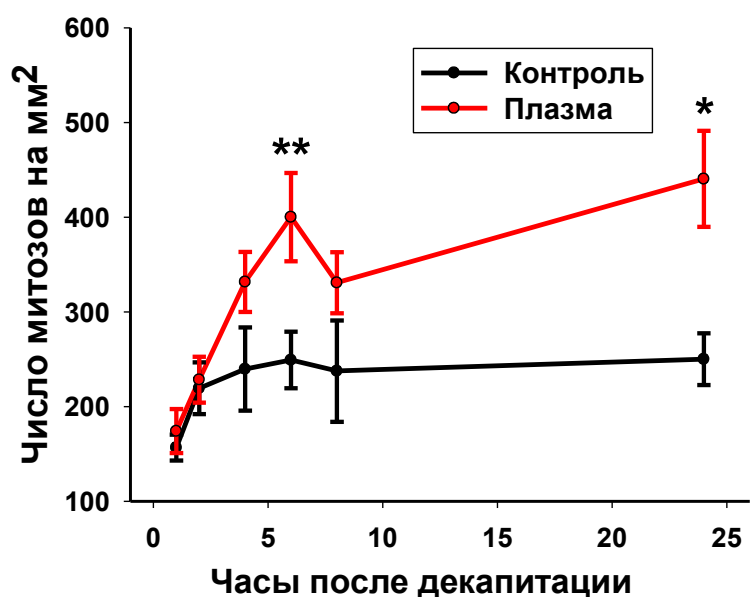


Рис. 3. Изменения динамики пролиферации стволовых клеток регенерирующих планарий после облучения НТАП в стимулирующем режиме. ** $p < 0,05$; * $p < 0,01$

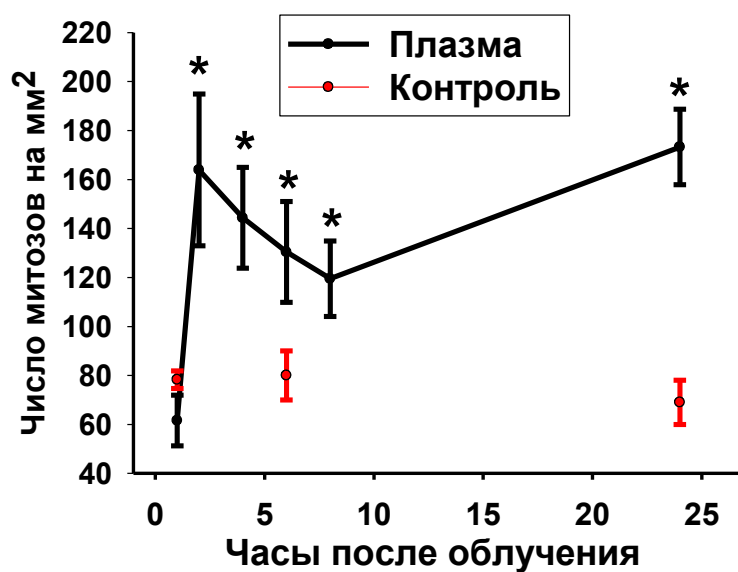


Рис. 4. Динамика пролиферации стволовых клеток интактных планарий после облучения НТАП в стимулирующем режиме. * $p < 0,01$

На рисунке 5 представлено исследование динамики пролиферативной активности стволовых клеток у регенерирующих планарий после воздействия ингибирующего режима. Данный режим на 4-й и 6-й час регенерации слабо увеличивает число

митотических клеток, (величина эффекта составляла $36\% \pm 19\%$ ($p < 0,05$) и $23\% \pm 20\%$ ($p < 0,05$) соответственно), а затем к 24-му часу наблюдается снижение пролиферации на $28\% \pm 8\%$ ($p < 0,01$).

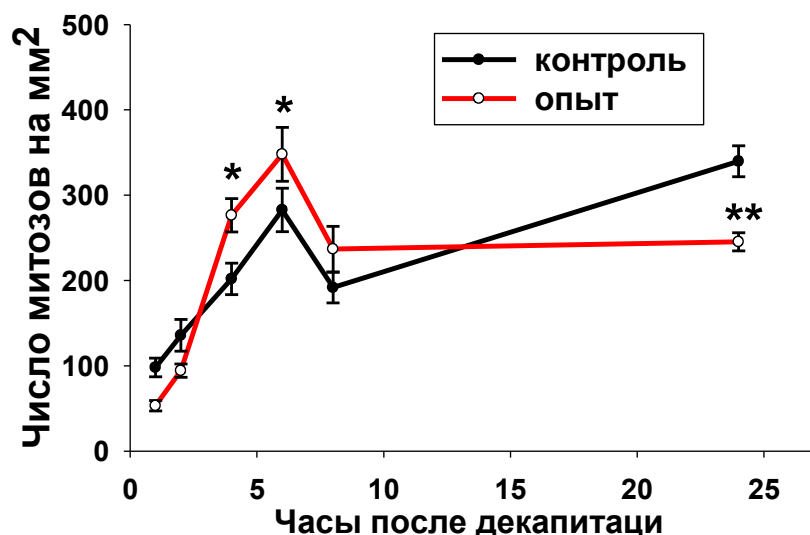


Рис. 5. Изменения динамики пролиферации стволовых клеток планарий после облучения НТАП в режиме, ингибирующем регенерацию бластемы. ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$

Наблюдаемые эффекты стимуляции или ингибирования регенеративного процесса после воздействия низкотемпературной аргоновой плазмы у плоских червей планарий, как мы и предполагали, связаны с воздействием этого фактора на активность стволовых клеток. Как известно, активация пролиферации необластов у планарий производится поверхностным эпителием, который реагируя на внешнее физическое и/или химическое воздействие запускает синтез морфогенов обеспечивающих процесс регенерации [14]. Вероятно, обработка стимулирующим режимом НТАП активирует весь поверхностный эпителий планарий, что в конечном счете приводит к значительному пролиферативному всплеску стволовых клеток и ускорению регенерации. Это подтверждается также, тем, что при облучении интактных планарий мы видим некое подобие пролиферативного всплеска необластов, наблюдаемое при активации регенерации. Характерно, что и ингибирующий режим облучения НТАП вначале регенерации активирует пролиферативную активность необластов, но уже на 24 час, видимо, в силу накопления в воде и организме планарий значительного количества свободных радикалов и других интермедиатов, подавляющих

пролиферацию, мы наблюдаем снижение количества митотических клеток в теле животных. Таким образом, нами показано, что с помощью разных режимов воздействия низкотемпературной аргоновой плазмы возможно контролировать активность стволовых клеток в условиях *in vivo*.

Исследование выполнено по проекту изучения биологических эффектов НТАП, инициированному профессором G. Morfill (The Max-Planck Institut für extraterrestrische Physik, Ringberg, Germany). Работа была выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 12-04-01086-а и № 12-04-32091 мол а.

Литература

1. Alkawareek M.Y., Gorman S.P., Graham W.G., Gilmore B.F. (2013) Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. Int J Antimicrob Agents. pii: S0924-8579 (13) 00325-7.
2. 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.
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. Bundscherer L., Wende K., Ottmüller K., Barton A., Schmidt A., Bekeschus S., Hasse S., Weltmann K.D., Masur K., Lindequist U. (2013) Impact of non-thermal plasma treatment on MAPK signaling pathways of human immune cell lines. Immunobiology. 218(10). P. 1248-55.
6. Von Woedtke T., Haertel B., Weltmann K.D., Lindequist U. (2013) Plasma pharmacy - physical plasma in pharmaceutical applications. Pharmazie. 68(7). P. 492-8.
7. Bogle M.A., Arndt K.A., Dover J.S. (2007) Plasma skin regeneration technology. Arch. Dermatol. 6(11). P. 1110-2.
8. Ермаков А.М., Ермакова О.Н., Маевский Е.И., Васильев М.М., Петров О.Ф., Фортов В.Е. (2010) Влияние низкотемпературной аргоновой плазмы на

скорость регенерации планарий. Интернет издание Биомедицинский журнал www.medline.ru Т. 11: 160-167.

9. Ермаков А.М., Ермакова О.Н., Маевский Е.И., Васильев М.М., Петров О.Ф., Фортон В.Е. (2011) Облучение низкотемпературной аргонной плазмой может стимулировать или тормозить регенерацию планарий. Интернет-издание Биомедицинский журнал medline.ru, Т. 12, С. 948-958.
10. Baguña, J. (1981) Planarian neoblasts. *Nature*. 290. P. 14-15.
11. Gentile L., Cebrià F., Bartscherer K. (2011) The planarian flatworm: an in vivo model for stem cell biology and nervous system regeneration. *Dis. Model. Mech.* 4(1). P. 12-19.
12. Newmark P.A., Sanchez Alvarado A. (2000) Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev. Biol.* 220. P. 142-153.
13. Ермакова О.Н., Ермаков А.М., Тирас Х.П., Леднев В.В. (2009) Влияние мелатонина на регенерацию планарий *Girardia tigrina*. Онтогенез. Т. 40(6). С. 466-469.
14. Wenemoser D., Lapan S.W., Wilkinson A.W., Bell G.W., Reddien P.W. (2012) A molecular wound response program associated with regeneration initiation in planarians. *Genes Dev.* 26(9). P. 988-1002.