

УДК 57.043

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СЛАБЫХ КОМБИНИРОВАННЫХ МАГНИТНЫХ
ПОЛЕЙ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ, ПРОЛИФЕРАЦИЮ НЕОБЛАСТОВ И ЭКСПРЕССИЮ
РАНА-ИНДУЦИРУЕМЫХ ГЕНОВ У ПЛАНАРИЙ

Ермаков А.М.^{1,2}, Скавуляк А.Н.¹, Ермакова О.Н.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино,
Институтская 3, РФ

²Межрегиональное общественное учреждение «Институт инженерной физики»

142210,, Московская обл., г.Серпухов, Б. Ударный пер., д. 1а, РФ

e-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Резюме

Экспериментально показана возможность изменять скорость регенерации планарий с помощью переменных магнитных полей, настроенных в соответствии с теорией В.В. Леднева в режиме параметрического резонанса на ионы Ca^{2+} и K^{+} . Ускорение регенерации планарий при воздействии «кальциевого» КМП связано с увеличением уровня экспрессии рана-индуцируемых генов дифференцированных и стволовых клеток и увеличением митотической активности неопластов планарий. Торможение регенерации планарий при воздействии «калиевого» КМП связано с уменьшением уровня экспрессии рана-индуцируемых генов дифференцированных и стволовых клеток и митотической активности неопластов. Под воздействием КМП, настроенных на разные мишени, может изменяться транскрипция различных генов планарий, последующая митотическая активность неопластов и соответственно скорость регенерации планарий.

Ключевые слова: слабые комбинированные магнитные поля, планарии, регенерация, митотическая активность, экспрессия генов.

STUDY THE EFFECT OF WEAK COMBINED MAGNETIC FIELDS ON
REGENERATION, NEOBLASTS PROLIFERATION AND EXPRESSION OF WOUND-
INDUCED GENES IN PLANARIANS

Ermakov A.M.^{1,2}, Skavulyak A.N.¹, Ermakova O.N.¹

*¹Federal State Budget Organization of Science, Institute of Theoretical and Experimental
Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Russia, Institutskaya 3*

*²Inter-regional public institution "Institute of Engineering Physics» 142210, Serpukhov, Russia,
B. Udarniy per., D. 1a.*

Abstract

In experimental studies, we have found the ability to change the regeneration rate of planarians using alternating magnetic fields tuned to parametric resonance for the ions Ca^{2+} and K^{+} in accordance with the Lednev's theory. Acceleration of planarian regeneration under the influence of the "calcium" combined magnetic field associated with the activation of the expression of wound-inducible genes in differentiated and stem cells and an increase in mitotic activity of planarian neoblasts. Deceleration of planarian regeneration under the "potassium" combined magnetic field associated with a decrease in the expression of wound-inducible genes in differentiated and stem cells, and a decline in mitotic activity of neoblasts. Combined magnetic fields tuned to different target change differently transcription of various planarian genes, as well as subsequent mitotic activity of neoblasts and planarian regeneration.

Keywords: weak combined magnetic fields, planarian regeneration, mitotic activity, expression of genes.

Введение

В настоящее время установлено, что слабые переменные магнитные поля (МП), сравнимые по амплитуде с Земным, способны оказывать существенное влияние на метаболические и функциональные свойства биологических систем разного уровня организации, в том числе на человека и животных (Belova, Acosta-Avalos, 2015). В большинстве публикаций сообщается об исследовании биоэффектов «переменных» МП с частотой 50-60 Гц и с величиной амплитуды 1-200 микроТесла (мкТл). Выбор параметров являлся по существу произвольным и определялся, главным образом тем, что целью многих экспериментальных проектов было исследование возможных эффектов электромагнитных полей промышленных частот. Однако, при этом не учитывалось наличие неизбежное влияние постоянного МП Земли. Следовательно, наблюдаемые

эффекты практически всегда являются результатом воздействия на биосистемы модулированного переменного МП в комбинации с постоянным МП Земли, то есть - комбинированного МП (КМП). Последствия такого воздействия при использовании существующих и разрешенных в медицинской практике генераторов МП, как правило, трудно предсказуемы, что снискало им не лучшую известность. Ряд клиницистов демонстрировали удивительные позитивные воздействия генераторов МП. Многие с такой же настойчивостью отрицали возможность использования МП для целенаправленного воздействия. Такая ситуация сложилась вследствие отсутствия в медицинской и биотехнологической практике обоснованных представлений о возможном механизме и необходимости специализированной настройки генераторов МП для достижения требуемого биологического эффекта. Разработанные В.В. Ледневым и Либовым теории воздействия комбинированного МП на биологические объекты обусловили возможность и необходимость исследования и применения точно контролируемых КМП на биологические объекты (Liboff, 1992; Леднев, 1994).

В работах Леднева и др. (Леднев и др., 1996; Lednev et al., 2005; Belova et al., 2007; Белова и др., 2010) было показано, что комбинированные магнитные поля (КМП), настроенные в режиме параметрического резонанса такие мишени, как ионы кальция (Ca^{2+} -КМП), калия (K^{+} -КМП) и атомы водорода существенно влияют на регенерацию и пролиферацию стволовых клеток планарий. Показано, что Ca^{2+} -КМП ускоряло рост головной бластемы и увеличивало количество митотических клеток в теле планарий *G. tigrina*, а K^{+} -КМП замедляло регенерацию и уменьшало количество митозов (Леднев и др., 1996; Belova et al., 2007). Авторы работы регистрировали общий пул митотических фигур в суспензии клеток, полученных из области постбластемы планарий после суточной инкубации регенерантов в колхицине, но не исследовали динамику митотической активности, которая меняется в процессе регенерации планарий (Wenemoser, Reddien, 2010). Поскольку пролиферация неопластов регулируется ран-индуцируемыми генами, экспрессия которых активируется в дифференцированных клетках и неопластах в ответ на повреждение тела животного (Wenemoser et al., 2012), было целесообразно изучить уровень транскрипции этих генов. Для данного исследования необходимо использовать другой вид планарий *Schmidtea mediterranea*, у которого прочитан геном и более детально исследована динамика митотической активности неопластов при регенерации (Sanchez Alvarado, 2007).

Цель работы заключалась в исследовании влияния слабых комбинированных магнитных полей, настроенных в режиме магнитного параметрического резонанса на ионы кальция или калия на регенерацию, пролиферацию неопластов и экспрессию ран-

индуцируемых генов в дифференцированных клетках и необластах у планарий *Schmidtea mediterranea*.

Материалы и методы

Животные.

Планарий *Schmidtea mediterranea* бесполоую лабораторную расу плоских червей содержали в «искусственной прудовой воде» (смесь водопроводной и дистиллированной воды в пропорции 2:1 при комнатной температуре, кормили раз в неделю личинками двукрылых. Для экспериментов отбирали животных длиной около 10 мм и прекращали их кормление за 7 дней до опытов. После ампутации 1/5 части тела планарий, содержащей головной нервной ганглий, на 3 сутки регистрировали регенерацию отсеченной части тела.

Прижизненная компьютерная морфометрия.

Скорость роста регенерации головной бластемы планарий оценивали методом прижизненной морфометрии. Молодая формирующаяся бластема в первые дни не покрыта пигментным эпителием, в отличие от старой части тела, что позволяет четко выделить растущую область на фоне старой части тела (Шейман и др, 1989). Изображения регенерирующих планарий получали с помощью комплекса, включающего фотокамеру MRc (Carl Zeiss, Германия), смонтированную на окуляре на бинокулярном микроскопа МБС-10 (ЛЗОС, Россия).

Общую площадь тела животного и площадь бластемы определяли с помощью оригинальной программы Plana 4.4, разработанной А. А. Деевым (ИТЭБ РАН). Количественным критерием роста служил 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 ($R_{\text{к}}$) определяли по формуле:

$$\Delta R = \left(\frac{(R_{\text{э}} - R_{\text{к}})}{R_{\text{к}}} \pm \frac{\Delta R}{R_{\text{к}}} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sqrt{(\delta_{\text{э}}^2 + \delta_{\text{к}}^2)}}{\Delta R} \right)^2 + \left(\frac{\delta_{\text{к}}}{R_{\text{к}}} \right)^2} \right) \cdot 100\%$$

- 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% при $n=60$.

Техника получения магнитных полей

В работе использовали комбинированные магнитные поля (КМП), состоящие из коллинеарно направленной постоянной компоненты B_{DC} , и переменной, B_{AC} . Постоянной компонентой служило локальное поле Земли в месте расположения биологического объекта. Переменную компоненту, ориентированную параллельно земному полю, создавали с помощью катушечной пары Гельмгольца диаметром 60 см (рис. 1). Планарий в стаканах объемом 20 мл помещали в затемненную камеру, расположенную в центре катушек. Контрольная группа животных находилась в такой же камере, установленной вне действия магнитного поля катушек. Величина постоянной компоненты поля B_{DC} определялась с помощью феррозондового магнитометра типа СГК-64М (завод "Геологоразведка") с точностью ± 0.01 мкТл. Амплитуду и частоту переменной компоненты, задавали специально сконструированным генератором (при содействии МОУ ИИФ, г. Серпухов), позволяющим создавать синусоидальное переменное магнитное поле с требуемыми параметрами амплитуда/частота (1 нТл – 100 мкТл, 1 Гц – 10000 Гц). Для этого генератор тока согласовывался с катушками Гельмгольца и калибровался частотомером и магнетометром. Значения соотношения амплитуд постоянного и переменного компонентов поля B_{AC}/B_{DC} , а также частоты, f_{AC} , переменной компоненты поля устанавливались в соответствии с теорией МПР. Согласно теории, наибольшая величина биоэффекта достигается при точной настройке КМП на основную, или «циклотронную», частоту для данного иона или атома, которая достигается при $B_{AC}/B_{DC} = 1.84$ (Lednev, 1994; Леднев, 1996).

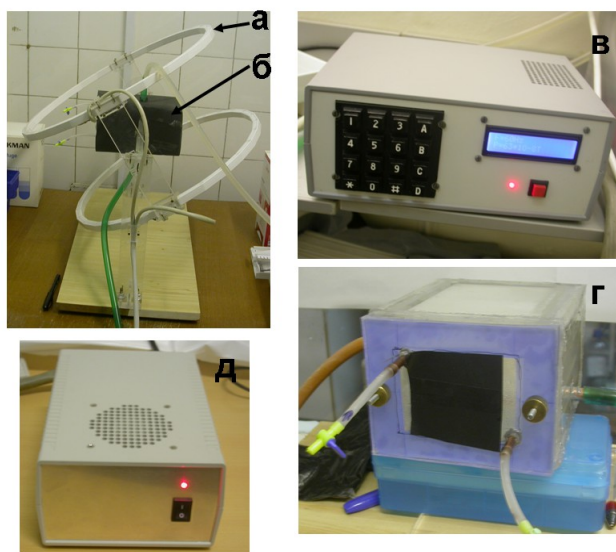


Рис. 1. Магнитная установка, применяемая в экспериментах. а – катушки Гельмгольца, б – термостатируемая камера для биообъектов, в – генератор переменного тока, подаваемого на катушки, г – термостатируемая камера для экспонирования контрольных образцов, д – блок питания генератора.

Иммуногистохимическое маркирование клеток в теле планарий

Планарий обездвигивали в течение 5 мин в 7% растворе N-ацетил цистеина (Sigma, США) и фиксировали в 4% растворе формальдегида в фосфатно-солевом буфере + 0,3 % Тритон X100 в течение 20 мин (Pearson et al., 2009; King and Newmark, 2013). Дальнейшие процедуры проводили согласно протоколу, описанному в работе Ньюмарка и Альварадо (Newmark and Sanchez Alvarado, 2000). Для выявления митотических клеток в теле планарий использовали первичные антитела на фосфорилированный гистон 3 (Santa Cruz, США) в разведении 1/1000 и вторичные антитела с флуоресцентным красителем CF488A (Biotium, США) в разведении 1/1000.

Планарий после отмытки от вторичных антител помещали в среду для иммунофлуоресценции Vectashield (Vector Labs, США) и микроскопировали с помощью конфокального микроскопа Leica Microsystems SP5 (Германия). 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 (митотический индекс). Полученные значения усредняли по 10 животным в каждой серии из 3-х независимых экспериментов. Изменение митотической активности необластов оценивали по формуле, приведенной в разделе «Прижизненная компьютерная морфометрия», где вместо индекса регенерации использовали значения митотического индекса (Ermakova et al., 2009).

Определение экспрессии генов (ПЦР в реальном времени)

После воздействия магнитного поля брали по 5 планарий из опытных и контрольной группы для выделения мРНК с помощью набора магнитных частиц согласно прилагаемому протоколу (Sileks, Россия). Обратную транскрипцию проводили набором фирмы Sileks (Россия) с использованием oligo dT праймера согласно прилагаемому протоколу. Полученная кДНК служила матрицей для ПЦР в реальном времени. Для реакции использовали реакционную смесь с SybrGreen (Syntol, Россия) и амплификатор CFX-96 (BioRad, USA). У планарий определяли экспрессию 46 генов, контролирующих ранние стадии регенерации в дифференцированных клетках и необластах (Wenemoser et al., 2012). Уровень транскрипции генов нормировали по средней величине транскрипции хаус-кипинг генов *Smed-ef1* и *Smed_01699*. Контаминация геномной ДНК определялась по образцу без стадии обратной транскрипции на основании геном-специфических праймеров. Ген - специфические праймеры подбирали с помощью программы Primer Express (Applied Biosystems, USA). Каждое измерение проводили 3 раза и усредняли по 3-м независимым образцам. Контролем служил образец без стадии обратной транскрипции.

Полученные данные по экспрессии генов анализировали с помощью онлайн сервиса <http://www.sabiosciences.com/>, программы mayday-2.14 (Center for Bioinformatics Tübingen, Германия) и программы Genesis (Sturn et al., 2002).

Статистическая обработка полученных результатов

Экспериментальные данные обрабатывали статистически с помощью программы "Sigma-Plot 9.11" (Systat Software Inc., Германия) методом дисперсионного однофакторного анализа ANOVA, а также с использованием параметрического критерия Стьюдента при нормальном распределении и непараметрического статистического критерия Манна-Уитни. Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ ошибка среднего.

Результаты и обсуждения

Воздействие Ca^{2+} -КМП в течение трех суток сопровождалось ускорением роста головной бластемы. Величина ускорения зависела от частоты КМП (рис. 2, а): максимальный прирост $+24\% \pm 6\%$ был при 29 Гц. Сдвиг частоты переменной компоненты МП в любую сторону от максимума уменьшал стимулирующий эффект, и на 26 Гц и 32 Гц не было отличий ΔR от контроля.

Воздействие K^{+} -КМП замедляло рост головной бластемы (рис. 2, б): максимальное торможение составляло $-23\% \pm 6\%$ при частоте 15 Гц. Увеличение или уменьшение частоты переменной компоненты МП сопровождалось уменьшением торможения. При частотах 12 Гц и 18 Гц эффект K^{+} -КМП отсутствовал: величина ΔR не отличалась от значений этого показателя у животных контрольных групп, которые находились при обычном постоянном МП Земли.

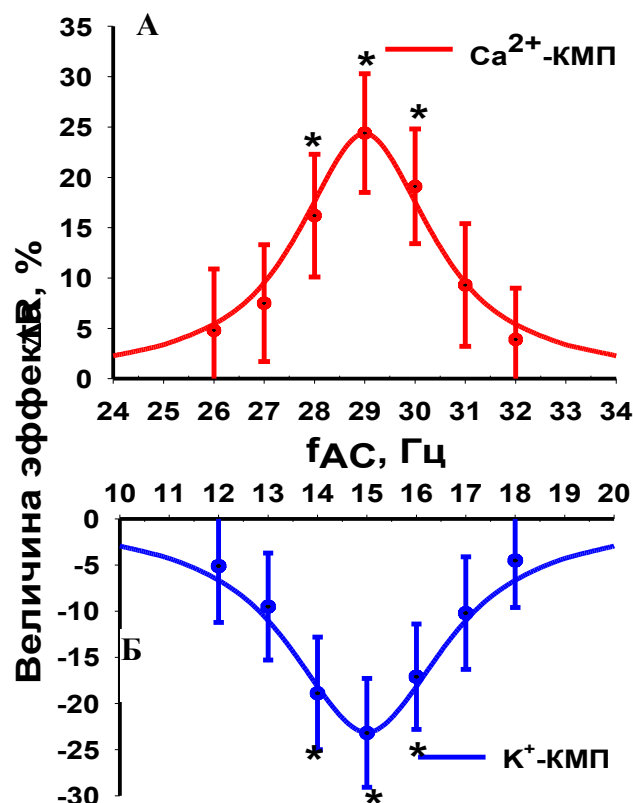


Рис. 2. Зависимость скорости регенерации планарий *S. mediterranea* от частоты переменной компоненты Ca²⁺-КМП (А) и K⁺-КМП (Б). На рисунке в виде сплошной линии показана теоретически ожидаемая величина эффекта. Точками, с величинами среднего и среднеквадратической ошибкой показаны экспериментальные данные. Параметры КМП: V_{DC} = 38 мкТл, V_{AC}=70 мкТл. *p<0,001

Изменение динамики митотической активности необластов анализировали в течение первых суток воздействия КМП после декапитации планарий гистохимическим методом whole mount.

Без воздействия КМП непосредственно после декапитации количество митотических клеток составляло в среднем 122 на мм²; к 3-му часу после декапитации количество митозов увеличивалось в 1,7 раза (p<0,001) (рис. 3) и достигало максимума - 262 на мм² к 6 - му часу. Через 8 часов после декапитации уменьшалось до 201 на мм² (p<0,001), и к 24 часу вновь возрастало до 277 на мм² (p<0,001).

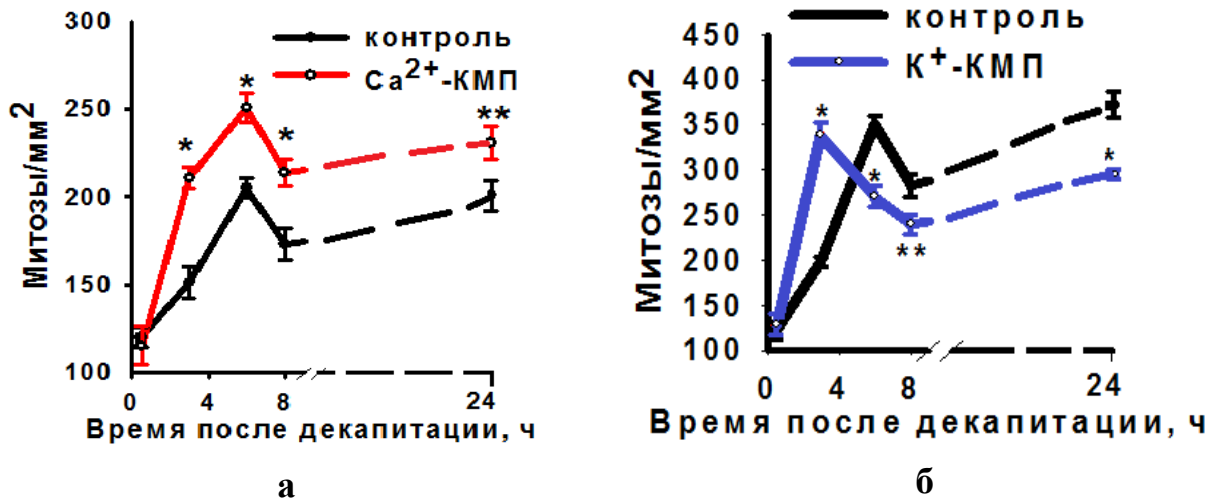


Рис. 3. Динамика пролиферации необластов регенерирующих планарий в контроле и под воздействием КМП, настроенного на параметрический резонанс для ионов кальция (Ca^{2+} -КМП) (а) и ионов калия (K^{+} -КМП) (б). Выбраны максимально эффективные параметры КМП: $B_{DC} = 38$ мкТл, Ca^{2+} -КМП - $B_{AC} = 70$ мкТл, $f_{AC} = 29$ Гц; K^{+} -КМП - $B_{AC} = 70$ мкТл, $f_{AC} = 15$ Гц. * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Экспонирование регенерирующих планарий в Ca^{2+} -КМП (параметрический резонанс для ионов кальция) не сдвигало пролиферативную волну, но способствовало существенному повышению количества митотических клеток после декапитации у планарий, экспонировавшихся в КМП (рис. 3, а). Число митозов увеличивалось через 3 часа в 1,4 раза ($p < 0,001$) и к 6-му часу в 1,2 раза ($p < 0,001$). В последующие сроки регенерации планарий, подвергающихся воздействию Ca^{2+} -КМП, количество митотических необластов было выше контрольного уровня: к 8 часам регенерации на 20 % ($p < 0,001$), а к 24 часам – на 10 % ($p < 0,05$).

Воздействие на регенерирующих планарий K^{+} -КМП (параметрический резонанс для ионов калия) смещало пролиферативные пики на более ранний срок (рис.3, б), но снижало общую интенсивность митотической активности. В контроле максимальное количество митозов наблюдали через 6 часов после декапитации, тогда как после экспонирования планарий в K^{+} -КМП первый пролиферативный пик возникал через 3 часа, но затем через 6 - 8 часов уровень митотической активности снижался соответственно на 23 % ($p < 0,001$) и 15 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Далее митотическая активность несколько возрастала, но не достигала контрольного уровня (- 21 %; $p < 0,001$).

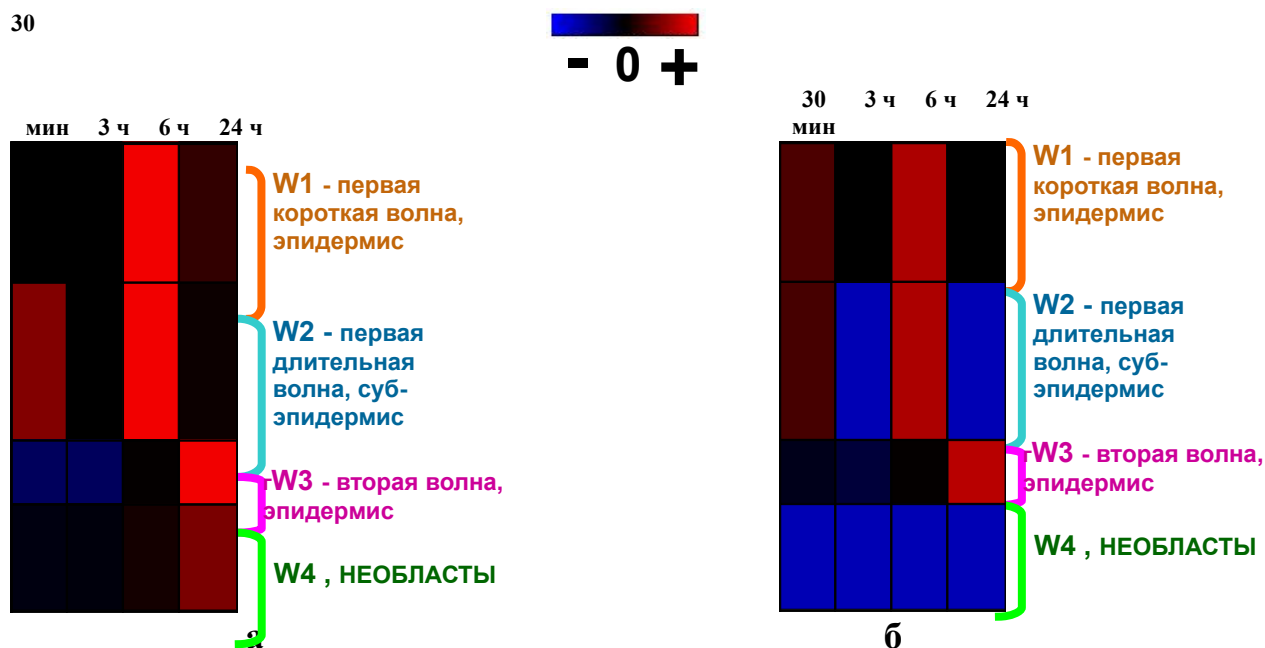


Рис. 4. Кластерный анализ динамики экспрессии генов у регенерирующих планарий после экспонирования в Ca^{2+} -КМП (а) и K^{+} -КМП (б) через 30 мин, 3 часа 6 и 24 часа после декапитации при параметрах магнитного поля, вызывающего максимальный биологический эффект на уровне регенерации головной части планарий. Данные приведены в цветовой логарифмической шкале с основанием 2. На цветных диаграммах градации синего цвета отражают степень ингибирования экспрессии генов, градации красного цвета - уровень стимуляции относительно необлученного контроля. Принадлежность генов к различным классам (W1, W2, W3 и W4) показана подписями справа от диаграмм.

Исследовали динамику экспрессии «рана – индуцируемых» генов (Wenemoser et al., 2012) (дифференцированных клеток эпидермального (группы W1 и W3) и субэпидермального слоя (группа W2), а также необластов (группа W4)) у регенерирующих планарий во время непрерывного экспонирования животных в после декапитации КМП. Было обнаружено, что при стимуляции регенерации и митотической активности необластов под влиянием Ca^{2+} -КМП уровень транскрипции генов менялся разнонаправлено (рис. 4, а). В первые 30 мин экспозиции в группах W1 и W4 экспрессия значительно не изменялась, в группе W2 экспрессия генов возрастала, а группе W3 тормозилась. Через 3 часа после декапитации и начала воздействия Ca^{2+} -КМП экспрессия генов в группе W1 и W2 была сравнима с контролем, а в группе W3 была ниже контрольного уровня. К 6 –му часу регенерации в результате экспонирования в Ca^{2+} -КМП резко увеличивалась транскрипция генов в группах W1 и W2, тогда как в W3 и W4 не отличалась от контроля. Через 24 часа экспонирования планарий в Ca^{2+} -КМП в группах W1 и W2 наблюдалось снижение экспрессии генов, тогда как в группе W3 и группе W4 транскрипционная активность значительно увеличивалась. Таким образом, ответная реакция

генов групп W1 и W2 дифференцированных клеток намного опережала активацию транскрипции генов в необластах (W4).

Воздействие K^+ -КМП на планарий после декапитации приводило к торможению транскрипции рана-индуцируемых генов необластов (группа W4) во все исследуемые сроки. В такой ситуации никакие изменения уровня экспрессии генов в дифференцированных клетках в принципе не могли повлиять на скорость регенерации животных, однако, очевидно, вследствие ранней активации генов группы W1 происходило более раннее появление первого пика митотической активности.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при воздействии Ca^{2+} -КМП на регенерирующих планарий увеличивается площадь бластемы за счет общего увеличения количества пролиферирующих необластов. Очевидно, Ca^{2+} -КМП активирует выход большего количества покоящихся необластов в пролиферацию. Кальциевое КМП на ранних сроках не влияло на гены группы W1, поэтому время пролиферативного пика не могло измениться. Однако величина уровня экспрессии генов группы W2 возрастала, что приводило к увеличению общей пролиферативной активности необластов, активированных после декапитации в большей степени, чем в контроле без дополнительной активации генов группы W2. Дальнейшее увеличение экспрессии рана-индуцируемых генов дифференцированных клеток в группах W1, W2 способствовало поддержанию повышенной митотической активности, однако решающим фактором стала окончательная одновременная активация экспрессии генов групп W3 и W4 через 24 часа, что и сказалось на увеличении скорости регенерации планарий через 3 суток после декапитации.

Воздействие K^+ -КМП приводило к смещению пролиферативного пика на ранний срок (через 3 часа), благодаря тому, что первоначально наблюдалась ранняя активация генов группы W1, способствующая пролиферации необластов, исходно находящихся в G2 фазе клеточного цикла. В более поздние сроки никакие изменения транскрипции в группах генов W1 W2 и W3 не могли изменить пролиферативную активность необластов, так как происходило стойкое подавление транскрипции генов в необластах (группа W4). В результате наблюдалась несколько отсроченное подавление митотической активности и торможение регенерации планарий в целом.

Приведенный материал дает основание связать уровень экспрессии генов в дифференцированных и стволовых клеток с изменением митотической активности необластов и скоростью регенерации планарий при воздействии исследуемых типов КМП. В отличие от описанных в литературе сдвигов экспрессии генов и митотической активности главным образом в необластах наши данные позволяют предположить

наличие важной роли участия экспрессии генов дифференцированных клеток в обеспечении высокого уровня общей митотической активности неопластов. При этом в случае отсутствия торможения экспрессии рана-индуцируемых генов неопластов решающим фактором в ускорении регенерации может быть высокий уровень активности дифференцированных клеток. Таким образом, получены свидетельства того, что система взаимодействия между дифференцированными и стволовыми клетками вносит существенный вклад в развитие ответной реакции регенерирующих планарий под влиянием стимулирующего кальциевого и ингибирующего калиевого КМП.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №14-04-01517 а.

Литература

1. Белова Н.А., Ермаков А.М., А.В. Знобищева, Сребницкая Л.К., Леднев В.В. (2010) Влияние крайне слабых переменных магнитных полей на регенерацию планарий и гравитационную реакцию растений. Биофизика., Т. 55(4). С. 704-709.
2. Леднев В.В. (1996) Биоэффекты слабых комбинированных, постоянных и переменных магнитных полей. Биофизика. 41(1): 224-232.
3. Леднев В.В., Сребницкая Л.К., Ильясова Е.Н., Рождественская З.Е., Климов А.А., Белова Н.А., Тирас Х.П. (1996(а)) Магнитный параметрический резонанс в биосистемах: экспериментальная проверка предсказаний теории с использованием регенерирующих планарий *Dugesia tigrina* в качестве тест-системы. Биофизика. 41(4): 815-825.
4. Леднев В.В. Сребницкая Л.К., Ильясова Е.Н., Рождественская З.Е., Климов А.А., Тирас Х.П. (1996(б)) Слабое комбинированное магнитное поле, настроенное на параметрический резонанс ядерных спинов атомов водорода, увеличивает пролиферативную активность неопластов в регенерирующих планариях *Dugesia tigrina*. ДАН СССР. 348(6): 830-833.
5. Шейман И. М., Тирас Х. П., Балобанова Э. Ф. (1989) Морфогенетическая функция нейропептидов. Физиол Ж СССР. 75: 619-626.
6. Belova N.A., Ermakova O.N., Ermakov A.M., Rojdestvenskaya Z. Ye., Lednev V.V. (2007) The bioeffects of extremely weak alternating magnetic fields. The Enviromentalist, v. 27, №4, p. 411-416.
7. Belova NA, Acosta-Avalos D. (2015) The Effect of Extremely Low Frequency Alternating Magnetic Field on the Behavior of Animals in the Presence of the Geomagnetic Field. J Biophys. 2015:423838.

8. Ermakova O.N., Ermakov A.M., Tiras Kh P., Lednev V.V. (2009) Melatonin effect on the regeneration of the flatworm *Girardia tigrina*. *Ontogenez*. 40(6):466-469.
9. King R.S., Newmark P.A. (2013) In situ hybridization protocol for enhanced detection of gene expression in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *BMC developmental biology*. 13(8).
10. Lednev V.V. (1994) Interference with the vibrational energy sublevels of ions bound in calcium-binding proteins as the basis for the interaction of weak magnetic fields with biological systems. In: Frey, A.H. (ed.), *On the Nature of Electromagnetic Field Interactions with Biological Systems*. R.G. Landes Co., Austin, TX: 59-72.
11. Lednev V.V., Ermakov A.M., Ermakova O.N., Rozhdestvenskaya Z.E., Srebnitskaya L.K., Tiras Kh.P. (2005) Modulation of the effect of pharmacological agents by weak and extremely weak alternating magnetic fields on a model of regeneration of the planarian *Girardia tigrina*. *Biophysics*. 50(Suppl. 1). P. S130-S133.
12. Liboff A.R. (1992) Interaction Mechanism of Low – Level Electromagnetic Fields and Living Systems. Eds. B. Norden, C. Ramel. Oxford: Oxford University Press.: 130-147.
13. Newmark P.A., Sanchez Alvarado A. (2000) Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Developmental biology*. 220(2):142-153.
14. Pearson B.J., Eisenhoffer G.T., Gurley K.A., Rink J.C., Miller D.E., Sanchez Alvarado A. (2009) Formaldehyde-based whole-mount in situ hybridization method for planarians. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 238(2):443-450.
15. Sanchez Alvarado A. (2007) Stem cells and the Planarian *Schmidtea mediterranea*. *Comptes rendus biologiques*. 330(6-7):498-503.
16. Sturn A., Quackenbush J., Trajanoski Z. (2002) Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics*. Vol 18, N 1. P 207-208.
17. 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 & Development*. 26(9):988-1002.
18. Wenemoser D., Reddien P.W. (2010) Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Developmental biology*. 344(2):979-991.