

ВЛИЯНИЕ СЛАБЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ В РАЗНЫЕ ФАЗЫ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЛАНАРИЙ

© 2015 г. Х.П. Тирас, О.Н. Петрова, С.Н.Мякишева*, С.С. Попова, К.Б. Асланиди**

Пуцинский государственный естественно-научный институт,
142290, Пуцино Московской области, просп. Науки, 3;

*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пуцино Московской области, Институтская ул., 3;

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пуцино Московской области, Институтская ул., 3

E-mail: kbaslanidi@gmail.com

Поступила в редакцию 20.10.14 г.

Проведен анализ эффектов слабых комбинированных магнитных полей, настроенных на циклотронную частоту иона Ca^{2+} , в разные фазы регенерации планарий. Показано, что регенерация планарий, регистрируемая через 72 ч после декапитации, сложным образом зависит как от продолжительности экспозиции, так и от времени между декапитацией и началом получасовой экспозиции. Обнаруженная зависимость может быть объяснена множественностью ферментативных мишеней, активирующихся в разные фазы процесса регенерации.

Ключевые слова: слабые магнитные поля, регенерация, планарии, ферменты, молекулярные мишени.

В настоящее время имеется достаточно сведений о том, что слабые комбинированные (переменные и постоянные) магнитные поля (КМП) с амплитудой, близкой к магнитному полю Земли, способны вызывать изменения в метаболизме самых различных живых организмов – от человека до микроорганизмов [1]. В современном мире, изобилующем бытовыми электрическими приборами, являющимися источниками электромагнитного поля, актуальность исследования механизмов действия таких полей не вызывает сомнения [2,3].

Физическая природа биологических эффектов слабых КМП до настоящего времени является причиной многочисленных дискуссий. Впервые С.Л. Албер рассматривал ион кальция в качестве мишени для слабых КМП [4], а А.Р. Либов [5] обнаружил, что эффективные частоты при действии слабых КМП совпадают с циклотронными частотами для ионов Ca^{2+} , Na^+ и других. Однако корректного физического обоснования циклотронная модель не получила. Результатом многочисленных дискуссий явилось лишь признание того факта, что биологические эффекты слабых КМП ($B \leq 10^{-4}$ Тл) не связаны с нагревом биологической системы. Позднее, в 1991 г., В.В. Ледневым [6] было высказано предположение о том, что мишенями слабых

КМП являются ионы, находящиеся в центрах связывания некоторых управляющих белков, таких как протеинкиназа С, кальмодулин и других, а взаимодействие ионов со слабыми КМП описывалось по аналогии с известным в атомной физике явлением параметрического резонанса. Привлечение теории интерференции угловых ионно-молекулярных состояний [7–10] только придало некоторую физическую строгость уже полученным экспериментальным результатам. Перечисленные модели взаимодействия иона с белком предполагают нелинейную зависимость вероятности конформационного отклика фермента (изменение скорости ферментативной реакции) от плотности вероятности волновой функции иона. В рамках приведенных представлений КМП с коллинеарно направленными постоянной (B_{DC}) и переменной (B_{AC}) компонентами влияют на живой организм при значениях частоты переменной компоненты поля f , формально равной циклотронной частоте иона с зарядом q и массой m в постоянном магнитном поле B_{DC} в вакууме. При этом предполагается, что биологические эффекты КМП обусловлены влиянием на скорость некоторых Ca^{2+} -зависимых биохимических реакций, в частности, реакций, опосредуемых протеинкиназой С и кальмодулинзависимыми реакциями [5–7,10].

Наличие одной или нескольких постоянно существующих молекулярных мишеней предпо-

Сокращения: КМП – комбинированные магнитные поля.

лагает накопление биологического эффекта при увеличении времени экспозиции живой системы в резонансном магнитном поле. Прямой эксперимент свидетельствует об отсутствии накопления и даже инверсии биологического эффекта в процессе регенерации [11]. Отметим, что многие эффекты слабых КМП часто плохо воспроизводимы или не могут найти объяснение в рамках существующих представлений. Плохая воспроизводимость биологических эффектов слабых и сверхслабых физических и химических воздействий может определяться рядом неконтролируемых в эксперименте экзогенных и эндогенных факторов, таких как физиологическое состояние организма, температура среды, электромагнитные поля и т.д. [12]. В частности, в экспериментах с регенерацией планарий обычно не учитывались такие параметры, как температура и фаза сложного и многостадийного процесса регенерации [6,7,11–13].

Целью настоящей работы является сравнение выявленных в разные фазы регенерации планарий эффектов слабых КМП, настроенных на циклотронную частоту иона Ca^{2+} (Са-КМП).

В процессе работы решались следующие задачи:

1. Количественные оценки результатов регенерации от продолжительности экспозиции в слабых Са-КМП.

2. Количественные оценки результата регенерации от времени после декапитации до начала получасовой экспозиции в слабых Са-КМП.

Ниже будет показано, что результат регенерации, регистрируемый через 72 ч после декапитации, сложным образом зависит как от продолжительности экспозиции, так и от времени после декапитации до начала получасовой экспозиции. Экспериментальная зависимость может быть объяснена множественностью ферментативных мишеней, активирующихся в разные фазы процесса регенерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах применялась бесполоя раса пресноводных червей – планарий *Dugesia (Girardia) tigrina*. Планарий кормили раз в неделю личинками двукрылых. Для экспериментов отбирали животных длиной около 10 мм и прекращали их кормление за семь дней до опытов. Регенерация вызывалась ампутацией головной части тела планарий и происходила в пластиковых чашках Петри ($d = 40$ мм), содержащих 13 мл аквариумной воды с $dH \approx 10$ градусов, рН 6,5. В каждой чашке находилось

по 30 особей. В контроле как до, так и после декапитации планарии содержались в термостатируемом помещении при температуре $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$, в постоянном электромагнитном поле с напряженностью $B_{DC} = 50 \cdot 10^{-6}$ Тл моделирующем естественное геомагнитное поле. Слабое Са-КМП с частотой 38 Гц, напряженностью постоянной компоненты $B_{DC} = 50 \cdot 10^{-6}$ Тл и напряженностью переменной составляющей $B_{AC} = 92 \cdot 10^{-6}$ Тл создавалось внутри катушки Гельмгольца. Для количественной оценки результата регенерации использовали метод прижизненной компьютерной морфометрии, который базируется на регистрации фотоконтраста между старыми и новыми частями тела регенерирующих планарий и позволяет количественно оценивать площади проекции регенерирующего фрагмента и образующейся бластемы [11,13].

Регистрация результата регенерации проводилась через 72 ч после удаления головного конца планарии. Для получения изображений планарий применяли бинокулярный микроскоп Stemi 2000-C, оснащенный цифровой видеокамерой AxioCam MRc (фирма «Zeiss», Германия). Электронные изображения планарий анализировали с помощью специального пакета программ Plana 5.0, в частности определяли площади проекции вновь сформированной бластемы s и регенерирующего фрагмента S . Коэффициент регенерации $R = s/S$ определялся для каждой группы планарий. Величину биологического эффекта рассчитывали как разность коэффициентов регенерации в экспериментальных R_{Ex} и контрольных R_C группах и выражали в процентах: $\Delta R = \frac{(R_{Ex} - R_C)}{R_C} 100\%$

[13]. В качестве R_C использовали значение коэффициента регенерации, полученное при непрерывной экспозиции планарий в постоянном магнитном поле $B_{DC} = 50 \cdot 10^{-6}$ Тл в течение 72 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первой серии экспериментов исследовали зависимость биологического эффекта от времени между декапитацией и началом получасовой экспозиции в Са-КМП. Планарий помещали через разные промежутки времени (от 0 до 72 ч) после отсечения головной части на 30 мин в Са-КМП. Площади проекции бластемы s и всего регенерирующего фрагмента S регистрировали через 72 ч после декапитации. Результаты экспериментов представлены на рис. 1.

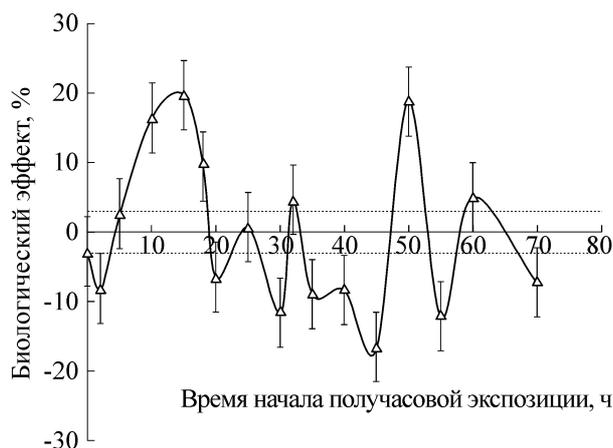


Рис. 1. Зависимость величины биологического эффекта от времени между декапитацией и началом полчасовой экспозиции в Са-КМП. По горизонтали — время от момента декапитации до начала полчасовой экспозиции, ч; по вертикали — биологический эффект $\Delta R = \frac{(R_{Ex} - R_C)}{R_C} 100\%$. Значению

R_C при $B_{DC} = 50 \cdot 10^{-6}$ Тл соответствует нулевая линия, а величина стандартного отклонения обозначена пунктирными линиями.

Обращает на себя внимание тот факт, что зависимость величины биологического эффекта 30-минутной экспозиции от времени после декапитации имеет фазный характер. Стимулирующие эффекты Са-КМП наблюдали через 15 ч (20%) и через 50 ч (20%) после декапитации. Тормозящий биологический эффект Са-КМП наблюдали через 2 ч (-7%) и через 45 ч (-18%) после декапитации.

Изменение величины и даже инверсия биологического эффекта, регистрируемого через 72 ч после декапитации, может свидетельствовать об изменении чувствительности организма к слабым электромагнитным полям в процессе регенерации. Можно предположить, что в разных фазах регенерации мишенями для слабого Са-КМП являются разные ферменты. Основанием для этого предположения служат известные факты последовательной работы многих ферментов в процессе клеточного цикла, в частности ферментов, ответственных за синтез ДНК, РНК, липидов и белков [14], а также различных циклинов.

В другой серии экспериментов планарий непосредственно после отсечения головной части помещали в слабое Са-КМП на время от 30 мин до 72 ч. Площади проекции бластемы и всего регенерирующего фрагмента регистрировали через 72 ч после декапитации. Результаты экспериментов представлены на рис. 2.

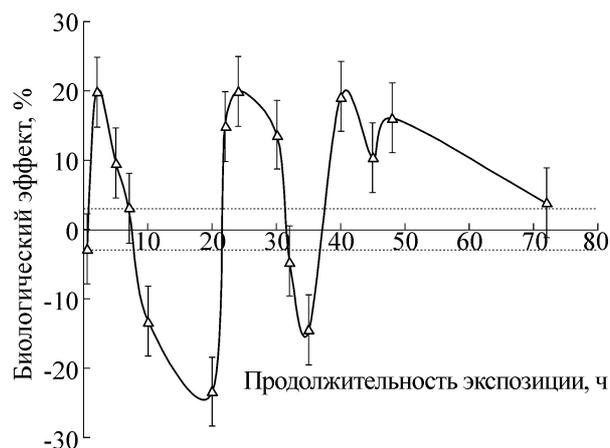


Рис. 2. Зависимость величины биологического эффекта от продолжительности непрерывной экспозиции в слабом Са-КМП. По горизонтали — продолжительность экспозиции, ч; по вертикали — биологический эффект $\Delta R = \frac{(R_{Ex} - R_C)}{R_C} 100\%$. Значению

R_C при $B_{DC} = 50 \cdot 10^{-6}$ Тл соответствует нулевая линия, а величина стандартного отклонения обозначена пунктирными линиями.

Зависимость величины биологического эффекта от продолжительности экспозиции в Са-КМП, регистрируемой через 72 ч после декапитации, и в этой серии экспериментов имела фазный характер. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что стимулирующие эффекты Са-КМП наблюдали при 2-часовой экспозиции (20%), второй пик приходился на экспозицию длительностью 25 ч (20%) и третий пик — при 40-часовой экспозиции (20%). Тормозящий биологический эффект Са-КМП наблюдали при 20-часовой (-25%) и 35-часовой (-18%) экспозициях. Полученный результат означает, что применяемая многими исследователями классификация СМП на активирующие или тормозящие [1,2,6,7,10,12] является ошибочной.

Отметим, что при непрерывной экспозиции в Са-КМП в течение 72 ч биологический эффект практически не регистрировался, хотя ранее в ряде работ [7,11] отмечалось положительное влияние Са-КМП на регенерацию, достигающее 20–25%. Единственным параметром, по которому различались упомянутые эксперименты, была температура.

В отдельной серии экспериментов нами была изучена временная динамика коэффициентов регенерации планарий при 22 и 26°C. Результаты экспериментов представлены на рис. 3.

Сравнение кривых на рис. 3 показывает, что у планарий, являющихся пойкилотермными организмами, все метаболические процессы су-

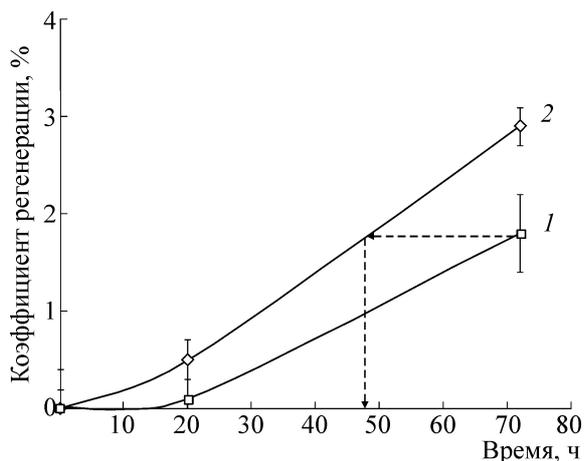


Рис. 3. Кинетики коэффициентов регенерации планарий при экспозиции в постоянном магнитном поле $B_{DC} = 50 \cdot 10^{-6}$ Тл при разных температурах: 1 – 22°C, 2 – 26°C.

щественно зависят от температуры окружающей среды. Величина коэффициента регенерации при 26°C опережает соответствующее значение при 22°C уже в первые сутки после операции. А через 72 ч при 26°C величина R_{Ex} уже превышает соответствующее значение при 22°C почти в два раза. Отметим, что коэффициент регенерации при температуре 26°C достигает значения $R_{Ex} = 1,8$, характерного для процесса регенерации при 22°C уже через 48 ч. Этот результат можно трактовать так, что определенная фаза регенерации, определяемая относительным значением площади прозрачной бластемы $R_{Ex} = 1,8$, при температуре 22°C достигается через 72 ч, а при температуре 26°C – уже через 48 ч.

На основании этих представлений было проведено сравнение зависимостей биологического эффекта от фазы регенерации, измеренной в единицах коэффициента регенерации.

Сравнение зависимостей на рис. 4 свидетельствует о том, что из пяти значений величины биологического эффекта, полученных при 22°C, четыре, с точностью до величины стандартного отклонения, совпадают с значениями, полученными при 26°C, при тех же значениях коэффициента регенерации или в той же фазе регенерации. Таким образом, активация или торможение процесса регенерации определяется не длительностью экспозиции регенерирующей планарии в слабых КМП, а физиологическим состоянием живой системы, в частности активностью определенных ферментов [14]. Отдельно отметим, что активация регенерации, зарегистрированная через 72 ч после декапитации, при непрерывной экспозиции в Ca-КМП при 22°C

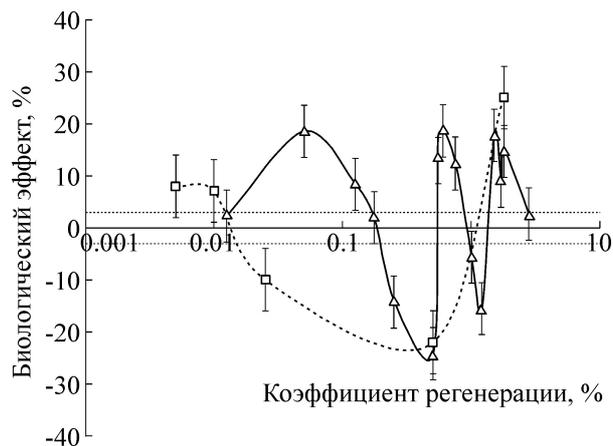


Рис. 4. Зависимости величины биологического эффекта от величины коэффициента регенерации планарии при непрерывной экспозиции в слабом комбинированном магнитном поле, настроенном на параметрический резонанс для иона Ca^{2+} при 22°C (квадраты и пунктирная линия) [11] и 26°C (треугольники и сплошная линия). По горизонтали – коэффициент регенерации планарии $R_C = s/S$, %; по вертикали – биологический эффект $\Delta R = \frac{(R_{Ex} - R_C)}{R_C} \cdot 100\%$. Условия экспериментов различались только температурой. Значению R_C при $B_{DC} = 50 \cdot 10^{-6}$ Тл соответствует нулевая линия, а величина стандартного отклонения обозначена пунктирными линиями.

[11] однозначно связана с фазой регенерации, определяемой величиной коэффициента регенерации $R_C = 1,8$. Действительно, при значении $R_C = 1,8$ величина биологического эффекта Ca-КМП как при 22°C, так и при 26°C составляет 22–25%.

ОБСУЖДЕНИЕ

По мнению некоторых авторов, «слабые» и «сверхслабые воздействия» характеризуются неопределенностью и зависимостью биологического эффекта от внешних или внутренних факторов [12]. Действительно, регенерация является сложным явлением, включающим детерминированную последовательность процессов некроза, апоптоза, пролиферации, дифференцировки и миграции в разных клеточных популяциях [13,15].

Однако при всей сложности исследуемой системы полученные результаты допускают однозначное толкование. В целом результаты экспериментов свидетельствуют о том, что чувствительность планарии к слабым КМП-полям зависит от стадии регенерации. Можно предположить, что в разных фазах регенерации мишенями для слабого Ca-КМП являются разные

ферменты. Активация одних ферментов ускоряет процесс регенерации, а активация других – тормозит.

Очевидно, что декапитация, запускающая процесс регенерации, вызывает механическое повреждение клеток, расположенных в непосредственной близости от раны, и окислительный стресс у клеток, которые подверглись резкому изменению ионного состава внеклеточной среды. Запускается процесс некроза клеток, плазматическая мембрана которых была сильно повреждена. Предполагается, что волна деполаризации, распространяющаяся от раневой поверхности, увеличивает вероятность апоптоза для поврежденных клеток. Стволовые (резервные) клетки планарий – необласты – фагоцитируют поврежденные клетки и вступают в митоз. Существует мнение [13,15], что имеется как минимум две популяции необластов, которые выходят в митоз; меньшая часть всех необластов (около 20%), находящихся в G2-фазе митоза, делится в течение первых часов после операции. Большая часть необластов проходит весь митотический цикл, и второй пик митоза наступает через сутки после декапитации. После митоза часть клеток мигрирует в бластему, увеличивая регистрируемую площадь проекции бластемы. Оставшиеся в регенерирующем фрагменте необласты продолжают поглощать клетки, находящиеся на разных стадиях апоптоза, и готовятся к очередному митозу. Митоз внутри бластемы, по-видимому, не происходит, так как отсутствуют гибнущие клетки, которые необходимы для наращивания биомассы (удвоения ДНК, РНК, белков и липидов). В процессе регенерации подобные циклы повторяются несколько раз [15].

Известно, что активности ферментов, участвующих в синтезе ДНК, РНК и белков, разделены по разным фазам клеточного цикла, причем изменяются не только потоки субстратов и продуктов распада, но и потоки неорганических ионов через плазматическую мембрану [14]. Это означает, что внутриклеточные активности таких ионов, как Ca^{2+} , K^+ и Na^+ , коррелируют с активностью вполне определенных ферментов.

Для объяснения обнаруженных зависимостей биологического эффекта от длительности экспозиции и от времени между декапитацией и началом получасовой экспозиции в слабом КМП предлагается следующая гипотеза:

1. Неорганические катионы Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} и другие являются лигандами для многих ферментов и конкурируют за центры связывания, причем единичный акт конформационного перехода фермента осуществляется только при

правильном заполнении всех центров соответствующими ионами.

2. Важнейшее отличие живой системы от набора ферментов *in vitro* заключается в том, что в клетке ферменты последовательно меняют свою активность, и в разные моменты времени после декапитации КМП действуют на разные ферменты, что и приводит к активации или торможению всего процесса регенерации в целом.

3. Мишенями для КМП, появляющимися и исчезающими в процессе регенерации, могут быть различные ферменты, в частности киназы, активность которых в разных фазах клеточного цикла различна.

Основываясь на предложенной гипотезе, легко объяснить полученные экспериментальные результаты и сделать соответствующие выводы:

1. Необходимым условием действия слабого электромагнитного поля на живую систему, кроме постулированных ранее [6–11] физических параметров (напряженностей B_{DC} , B_{AC} и частоты поля f), является эндогенный биологический фактор, характеризующий состояние определенных ферментов.

2. Сложный характер зависимости непрерывной экспозиции в слабых резонансных магнитных полях исключает эффект накопления и подтверждает предположения о множественности и сменяемости в процессе регенерации молекулярных мишеней для резонансных КМП.

3. Вид зависимостей результата регенерации от времени непрерывной экспозиции или времени после декапитации, а также анализ влияния температуры на регенерацию свидетельствует о связи определенных ферментативных мишеней с конкретными фазами сложного процесса регенерации.

В заключение отметим, что высказанная гипотеза нуждается в дополнительных теоретических и экспериментальных подтверждениях, что и является целью наших исследований в будущем.

Авторы выражают благодарность О.А. Морневу и Р.В. Полозову за полезные обсуждения, которые помогли сформулировать вышеприведенную точку зрения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта по проекту № 2912: «Восстановление поврежденной (травмированной) ткани слабыми низкочастотными комбинированными магнитными полями» в рамках Госзадания Министерства образования и науки РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. R. Liboff, *Electromagn. Biol. Med.* **32** (4), 442 (2013), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23323742>.
2. A. Foletti, S. Grimaldi, A. Lisi, et al., *Electromagn. Biol. Med.* **1** (2012).
3. E. D'Emilia, L. Giuliani, A. Lisi, et al., *Electromagn. Biol. Med.* **14**, 1 (2014).
4. S. L. Arber, *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* **17**, 227 (1985).
5. A. R. Liboff, *J. Biol. Phys.* **13**, 99 (1985).
6. V. V. Lednev, *Bioelectromagnetics* **12**, 71 (1991).
7. В. В. Леднев, *Биофизика* **41** (1), 224 (1996).
8. M. N. Zhadin and E. E. Fesenko, *Biomed. Sci.* **1** (3), 245 (1990).
9. V. N. Binhi, *Electro Magnetobiol.* **16** (3), 224 (1997).
10. В. Н. Бинги, *Принципы электромагнитной биофизики* (ФИЗМАТЛИТ, М., 2011).
11. X. П. Тирас, А. Н. Скавуляк, К. Б. Асланиди и Г. Р. Иваницкий, *Докл. РАН* **443** (6), 1 (2012).
12. В. В. Новиков, И. М. Шейман и Н. Д. Крещенко, *Биофизика* **54** (6), 1114 (2009).
13. X. П. Тирас и К. Б. Асланиди, *Тест-система для доклинического исследования медицинской и экологической безопасности на основе регенерации планарий* (Изд-во ТулГУ, 2013).
14. Л. Б. Асланиди, В. В. Булгаков, А. А. Замятнин (мл.) и др., *Докл. РАН* **360** (6), 823 (1998).
15. J. Baguná, E. Saló, and C. Auladell, *Development* **7** (1989).

Effects of Weak Magnetic Fields on Different Phases of Planarian Regeneration

H.P. Tiras*, O.N. Petrova*, S.N. Myakisheva, S.S. Popova*, and K.B. Aslanidi*****

**Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

****Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

We analyzed the effects of weak combined magnetic fields, tuned to the cyclotron resonance condition for calcium ions, obtained in different phases of planarian regeneration. We showed that the result of regeneration in 72 hours after decapitation depends on the length of exposure, and the time between decapitation and initiation of a half-hour exposure. The experimental dependence can be explained by a multiplicity of enzymatic targets activated in different phases of the regeneration process.

Key words: weak magnetic fields, regeneration, planarians, enzymes, molecular targets