

УДК 591.169/172:595.12:615.84

ДИНАМИКА СКОРОСТИ ДВИЖЕНИЯ ПЛАНАРИЙ, РЕГЕНЕРИРУЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ЭКРАНИРОВАНИЯ

Демцун Н.А., Темурьянц Н.А., Баранова М.М.

На основе компьютерных технологий анализа изображения разработан способ определения скорости движения планарий. Выявлена высокая положительная корреляция между этим показателем и индексом регенерации ($r = 0,95$). Показано, что при электромагнитном экранировании скорость движения возрастает в 1,2 раза больше, чем индекс регенерации.

Ключевые слова: электромагнитное экранирование, *Dugesia tigrina*, регенерация, скорость движения.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время планарии широко используются для изучения феноменологии и механизмов действия различных экологических факторов и в частности электромагнитных излучений [1 – 3]. Это связано с тем, что планарии, являясь наиболее примитивными представителями современной фауны, обладают уникальной способностью к регенерации целого организма из мельчайших фрагментов тела [4].

Регенерация планарий достаточно полно изучена [5, 6]. Исследована структура необластов – тотипотентных резервных клеток [7 – 9], молекулярные аспекты регуляции регенерации [10], гены, контролирующие этот процесс [6]. Регенерация планарий характеризуется не только структурными, биохимическими перестройками, но и изменениями поведенческих реакций. Последние изучены совершенно недостаточно. Адекватной характеристикой поведенческих реакций являются локомоторная активность, скорость движения. Способ определения скорости движения у планарий не разработан. В связи с изложенным, целью исследования явилась разработка способа определения скорости движения планарий и изучение ее динамики при регенерации, протекающей в различных условиях.

Задачи работы:

- 1) разработка способа регистрации скорости движения планарий;
- 2) определение взаимосвязи индекса регенерации и скорости движения интактных и регенерирующих животных;
- 3) исследование влияния электромагнитного экранирования различной продолжительности на скорость движения регенерирующих планарий;
- 4) сопоставление изменений индекса регенерации и скорости движения планарий, регенерирующих в различных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована лабораторная бесполовая раса планарий *Dugesia tigrina*, культура которой успешно культивируется в Таврическом национальном университете им. В.И. Вернадского (ТНУ). Планарии содержатся в пластиковых аквариумах объемом по пять литров в воде, представляющей собой смесь дистиллированной и водопроводной воды в пропорции 1:1. Аквариумы находятся в затемненных условиях, температура воды в них поддерживается от 19-21°. Кормление животных осуществляется один раз в неделю личинками двукрылых (мотылем). Кормление прекращается за семь дней до эксперимента. Условия содержания планарий полностью соответствуют таковым в Институте биофизики клетки РАН, откуда животные были завезены в ТНУ.

Для изучения регенерации планарий и скорости их движения использована их прижизненная морфометрия, использующая компьютерные технологии анализа изображений.

Для разработки способа определения скорости движения планарий важное значение имеет их способность к достаточно длительному однонаправленному движению в горизонтальной плоскости, осуществляемому за счет мерцания ресничек [11].

Для получения стандартных изображений регенерирующих планарий применялась установка, подробно описана ранее [12]. С ее помощью возможно вычисление основных геометрических характеристик тела планарий, бластемы, и в частности индекса регенерации $R=S_1/S_2$, где S_1 – площадь бластемы, S_2 – площадь всего тела регенерата в данный момент времени.

Видеоизображения движущихся в воде планарий регистрировалась с частотой 30 кадров в одну секунду. Скорость движения планарий вычислялась отношением пройденного ею пути ко времени в одну секунду. Путь измерялся наложением двух участков одного видеоряда с соответствующей разницей во времени. Контрастирование проводилось при помощи стандартной операции «вычитания» для двух изображений (рис. 1).

Для решения поставленных задач был проведен эксперимент осенью (октябрь-ноябрь) 2008 года.

Для эксперимента отбирали червей, длина которых составила $\approx 10 \pm 1$ мм, т.к. у животных большего размера преобладают движения за счет сокращения мускулатуры [4].

Регенерация вызывалась ампутацией 1/5 части головного конца тела планарий, содержащей головной ганглий, выше фаринкса (разрез Мария Антуанетта). Декапитация проводилась под бинокулярным микроскопом глазным скальпелем в нестерильных условиях.

Декапитированные планарии делились на три группы по 30 особей каждая и помещались в стеклянные стаканы, содержащие по 50 мл воды.

Для животных всех групп в течение всего эксперимента поддерживался одинаковый режим освещенности, температуры.

Животные первой группы служили биологическим контролем, то есть регенерация у них протекала без каких либо дополнительных воздействий.

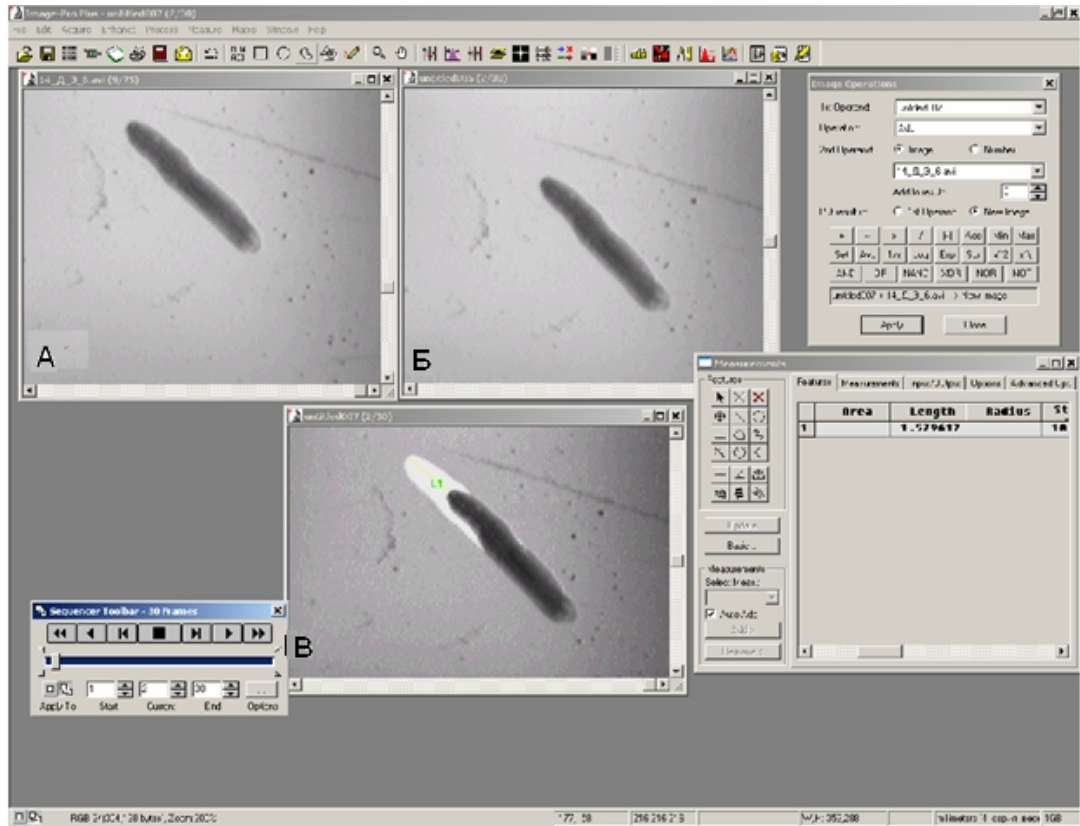


Рис. 1. Пример вычисления скорости движения планарии. (А, Б – участки видео ряда с разницей в одну секунду; В – результат наложения этих видеорядов при помощи покадрового вычитания изображений).

Планарии второй и третьей групп помещались в экранирующую камеру, конструкция которой была описана ранее [13]. Длительность пребывания в камере у планарий второй и третьей групп была различной.

Вторую группу содержали в экранирующей камере 23 часа в сутки в течение 15 дней. Ежедневно в течение одного часа (всегда в одно и то же время с 10 до 11 час.) проводили контроль регенерационных процессов, измерение температуры воды и т.д.

Животных третьей группы содержали в экранирующей камере ежедневно в течении одного часа (с 10 до 11 час.), а остальное время суток они находились в условиях, одинаковых с контрольной группой животных.

Фиксация изображений осуществлялась у животных всех групп ежедневно в течение 15 дней в одно и то же время суток.

Обработку экспериментальных данных проводили с помощью непараметрических методов. Вычислялась медиана (М), интерквартильный интервал между 25м и 75м процентилями, включающий 50% значений признака в выборке. Для изучения взаимосвязи изученных показателей использовали

корреляционный анализ по Спирмену. Оценку достоверности наблюдаемых изменений проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни и Вилкоксона.

Расчеты и графическое оформление полученных в работе данных проводились с использованием программы Microsoft Excell, программного пакета «STATISTICA – 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что индекс регенерации интактных животных со вторых по 13 сутки эксперимента возрастал с 0,01049 усл.ед по 0,107191 усл.ед. В динамике этого показателя отмечены периоды, когда он не изменялся. Так, на пятые и 11 сутки эксперимента данный показатель не возрастал относительно значений предыдущих четвертых и десятых суток соответственно. С 13 суток наблюдения рост индекса регенерации остановился, что может свидетельствовать об остановке роста бластемы. Этот вывод подтверждается полным формированием глаз и «ушей» у всех животных данной группы к этому сроку, а так же нулевые значения скорости индекса регенерации. Таким образом, регенерация интактных планарий протекала 13 суток (рис. 2).

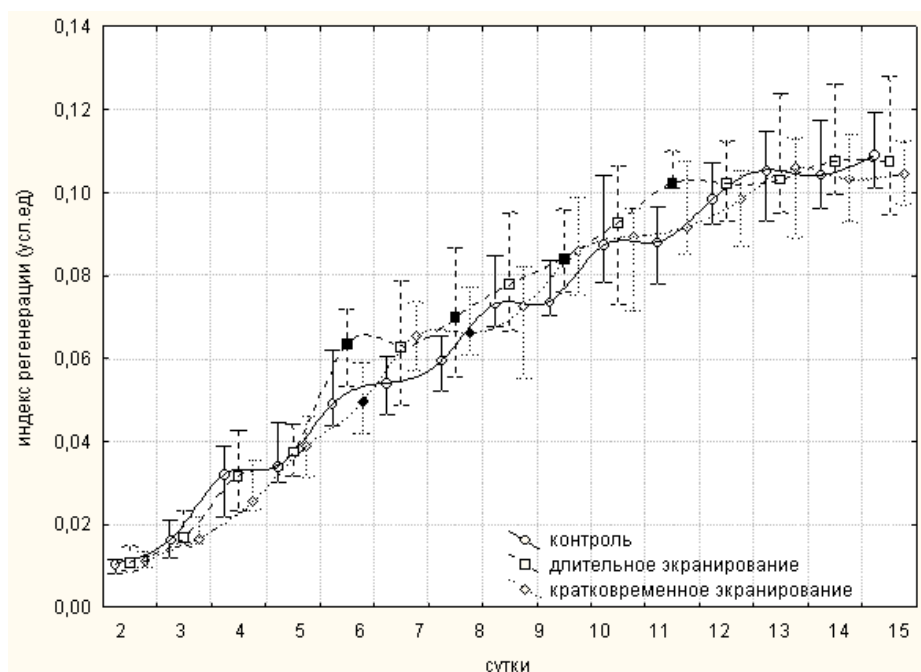


Рис. 2. Динамика индекса регенерации планарий в различных экспериментальных группах (осень 2008 года).

Заштрихованные точки – $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой; не заштрихованные – $p > 0,05$.

При сравнении результатов исследований, проведенных осенью, с данными, полученными нами в летних и зимних экспериментах [13], выяснено, что индекс

регенерации с третьих по 15 сутки эксперимента был на 26-52% ниже, чем летом, но на 52% – 115% выше, чем зимой. Кроме того, остановка роста бластемы в летнее время зафиксирована на двое суток раньше, чем осенью – на 11 сутки эксперимента.

Таким образом, регенерация планарий осенью протекает более быстро, чем зимой, но медленней, чем летом.

Вместе с возрастанием индекса регенерации планарий контрольной группы прогрессивно нарастала и скорость их движения. Со вторых по десятые сутки она увеличивалась с 1,0336 мм/сек до 1,4634 мм/сек, а с десятых по 12 сутки имело место возрастание этого показателя на 25% относительно десятых суток, который достигал 1,8204 мм/сек. На 12 сутки отмечен скачок данного показателя до 1,8294 мм/сек с последующим его падением к 13 суткам до 1,6374 мм/сек. Своего максимального значения скорость движения животных интактной группы достигала к 14 суткам эксперимента, когда она составила 1,9217 мм/сек и практически не изменялась в последующие дни наблюдения. Эти значения соответствуют скорости движения интактных планарий, измеренной до отсечения головы (1,83 – 2,15 мм/сек).

Таким образом, скорость движения планарий стабилизируется позже, чем индекс регенерации, что может свидетельствовать о том, что совершенствование функциональных возможностей регенерирующих планарий продолжается и после остановки роста бластемы.

Прогрессирующее возрастание скорости движения при регенерации головного конца планарий может быть связано с несколькими причинами, как-то: развитием головного мозга, аппарата движения, а так же усовершенствованием сенсорных систем.

Корреляционный анализ выявил высокий коэффициент корреляции ($r = 0,9582$, $p < 0,001$) между скоростью движения и индексом регенерации. Таким образом, можно утверждать, что динамика скорости движения планарий адекватно характеризует процесс регенерации планарий.

Электромагнитное экранирование стимулирует регенерацию планарий. Так, у животных, находившихся в экранирующей камере по 23 часа в сутки, начиная с третьих суток эксперимента индекс регенерации был выше относительно такового контрольной группы. Максимальные различия индексов регенерации были зафиксированы на шестые сутки эксперимента, когда они различались на 29%. С 12 суток рост данного показателя прекратился. Таким образом, продолжительность регенерации, протекающей в условиях длительного экранирования, сокращалась на одни сутки по сравнению с контрольной группой животных. В динамике индекса регенерации планарий, подвергавшихся длительному электромагнитному экранированию, заметна периодическая составляющая (рис.3).

Данные проведенных экспериментов согласуются с результатами наших исследований, проведенных летом и зимой [13]. Однако при сравнении результатов становится очевидной зависимость степени стимуляции регенерации электромагнитным экранированием от исходного уровня регенерации.

В условиях продолжительного электромагнитного экранирования индекс регенерации в осенней серии экспериментов возрастал более, чем в зимнее время, но медленнее, чем летом. Эти данные находятся в полном соответствии с законом начальных значений [14].

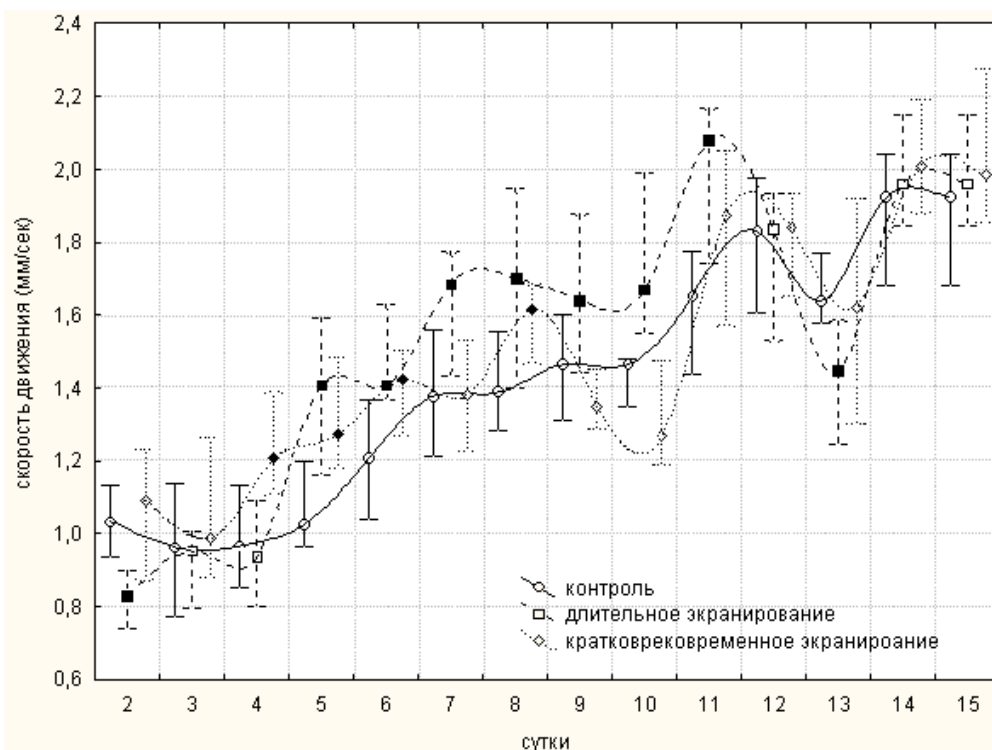


Рис.3. Динамика скорости движения планарий в контрольной группе, животных, подвергнувшихся длительному и кратковременному электромагнитному экранированию.

Примечание: заштрихованные точки – $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой; не заштрихованные – $p > 0,05$.

Скорость движения планарий, подвергавшихся длительному электромагнитному экранированию, по сравнению с данными контрольной группы, так же возрастала, но позже чем, индекс регенерации. На вторые сутки эксперимента изученный показатель составил 0,829 мм/с, что на 20% ниже скорости движения интактных животных. В последующие сутки отмечено нарастание скорости движения. Так на четвертые сутки скорость движения планарий составила 0,935 мм/сек, а на пятые уже 1,405 мм/сек ($p < 0,05$), что на 37% выше таковых интактных животных, к восьмым суткам значения данного показателя выросли до 1,7017 мм/сек, что на 23 % выше значений контрольной группы. С восьмых по десятые сутки была отмечена тенденция к падению этого показателя. Максимум данного показателя был отмечен на 11 сутки эксперимента – 2,079 мм/с, что на 26% выше значений контрольной группы в данные сроки. В последующие сроки было отмечено значительное падение скорости движения до 1,4446 мм/сек (на 13 сутки), с последующим ее ростом. Так к 14 суткам скорость движения планарий достоверно не отличалась от таковой интактных животных. Таким образом, в динамике скорости движения ярко проявлялась ритмическая составляющая (рис. 4).

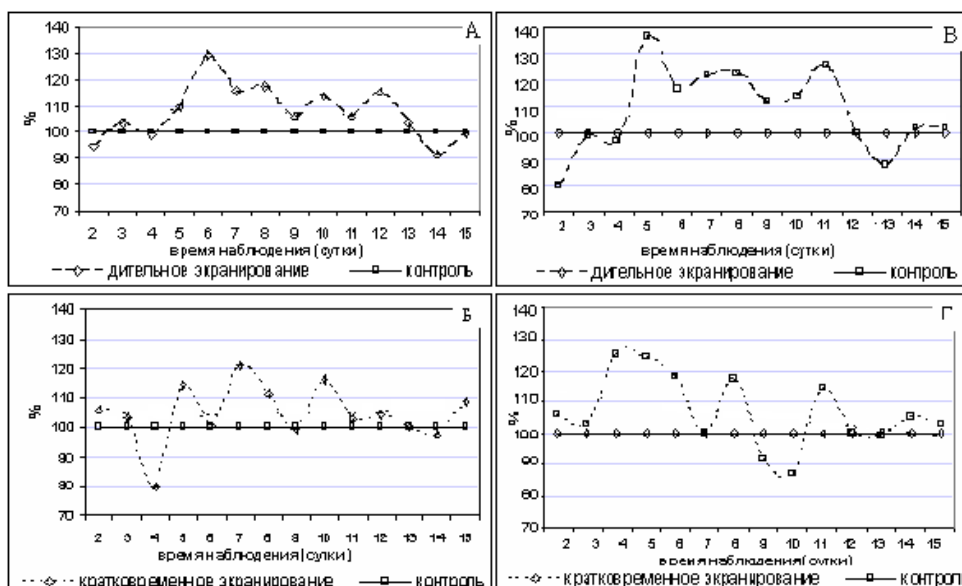


Рис. 4. Динамика скорости регенерации (А, Б) и скорости движения планарий (В, Г) в группах животных подвергнутых длительному и кратковременному электромагнитному экранированию в процентах относительно контрольных значений.

Корреляционный анализ выявил высокую положительную корреляцию между скоростью движения и индексом регенерации у животных этой группы (0,8009, $p < 0,001$). Некоторое его снижение относительно данных контрольной группы возможно связано с возрастанием ритмической составляющей в динамике скорости движения.

Таким образом, длительное электромагнитное экранирование приводит к возрастанию индекса регенерации и скорости движения планарий.

Кратковременное периодическое электромагнитное экранирование так же приводит к росту индекса регенерации. Значения данного показателя отличались от таковых контрольной группы животных, на седьмые, восьмые и десятые сутки эксперимента на 21%, 11% и 16% соответственно.

Скорость движения планарий данной группы нарастала с третьих по шестые сутки от 0,9877 мм/сек до 1,422 мм/сек. К восьмым суткам эксперимента значения данного показателя отличались от таковых контрольной группы животных на 17% (1,616 мм/сек, $p < 0,05$). На девятые – десятые сутки скорость движения планарий была ниже значений интактных животных на 8%, 13% соответственно. На 13 сутки эксперимента так же как и в других группах животных было отмечено падение скорости движения планарий. В последующие сутки эксперимента наблюдаемые изменения были незначительными.

Взаимоотношения между значениями индекса регенерации и скоростью движения планарий данной группы характеризуются положительным коэффициентом корреляции, равным 0,8769 ($p < 0,001$).

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что регенерация планарий сопровождается прогрессивным возрастанием скорости их движения.

Эта закономерность сохраняется в условиях электромагнитного экранирования различной продолжительности. Однако, обращает на себя внимание тот факт, что скорость движения при экранировании возрастает гораздо больше, чем индекс регенерации. Так, при длительном электромагнитном экранировании индекс регенерации возрастает в 16 раз по сравнению с контролем, а скорость движения в 19,5 раз. При кратковременном пребывании регенерирующих планарий в гипомангнитной среде скорость движения возрастает в 1,2 раза больше, чем индекс регенерации.

На основании этих данных можно заключить, что скорость движения является более чувствительным показателем, характеризующим реакцию регенерирующих планарий на действие гипомангнитного поля, чем индекс и скорость регенерации.

Учитывая то, что движение планарий, анализируемое нами, реализуется за счет мерцания ресничек, можно предположить, что электромагнитное экранирование изменяет их функциональную активность. Это предположение подтверждается данными экспериментов, проведенных как *in vitro*, так и *in vivo*. Так, было обнаружено ингибирование цилиарного аппарата эпендимоцитов у новорожденных крыс в условиях гипомангнитного поля [15]. В более поздних работах описано возрастание скорости движения и жизнеспособности человеческих сперматозоидов при их культивировании в нулевом магнитном поле [16].

Таким образом, при электромагнитном экранировании скорость движения регенерирующих планарий возрастает. Возможно, это связано изменением функционального состояния ресничек. Полученные данные значительно расширяют представления о возможных механизмах действия ослабленных магнитных полей.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ определения скорости движения планарий.
2. Скорость движения регенерирующих планарий коррелирует с индексом регенерации ($r = 0,9582$).
3. Скорость движения интактных планарий, как и индекс их регенерации, в условиях электромагнитного экранирования различной продолжительности возрастают.
4. Скорость движения планарий при электромагнитном экранировании возрастает в 1,2 - 1,25 раза больше, чем индекс регенерации.

Список литературы

1. Влияние слабого комбинированного магнитного поля на скорость регенерации планарий *Dugesia tigrina* / Х.П. Тирас, Л.К. Сребницкая, Е.Н. Ильясова, В.В. Ледне // Биофизика. – 1996. – Т. 40, №4. – С. 826-831.
2. Влияние слабых и сверхслабых комбинированных постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей и миллиметровых волн низкой интенсивности на регенерацию планарий *Dugesia tigrina* / В.В. Новиков, И.М. Шейман, А.В. Клубин, Е.Е. Фесенко// Биофизика. – 2007. – Т.53, №2. – С. 372 – 375.
3. Новиков В.В. Влияние слабых и сверхслабых магнитных полей на интенсивность бесполого

- размножения планарий *Dugesia tigrina* / В.В. Новиков, И.М. Шейман, Е.Е. Фесенко // Биофизика. – 2002. – Т.47, №1. – С. 125-129.
4. Regeneration and pattern formation in planarians: cells, molecules and genes / Baguna J., Saló E., Romero R., Garcia-Fernandez C. // Zool. Sci.- 1994. – Vol. 11. – P. 781 - 795
 5. From Planarians to Mammals - the many faces of regeneration // J.Moraczewski, K. Archacka, E. Brzoska, M. Ciemerych, I. Grabowska, K.Janczyk-ilach, W. Stremimska, M. Zimowska // Int J Dev Biol – 2008.- Vol. 52, - P. 2189-227
 6. Planarian regeneration: achievements and future directions after 20 years of research / E. Saló, J. Abril, T. Adell, F. Cebrià et al. // Int. J. Dev. Biol. – 2008.- Vol. 52 [In Press]
 7. Baguna J. Quantitative analysis of cell types during growth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina* / J. Baguna, R. Romero // Hydrobiologia - 1981. – Vol 84. - P. 181-194.
 8. Genetic network of the eye in Platyhelminthes: expression and functional analysis of some players during planarian regeneration / Saló E., Pineda D., Marsal M., González J., Gremigni V., Batistoni R. // Gene - 2002.- Vol. 287. - P. 67-74
 9. Sánchez-alvarado A. Planarian regeneration: its end is its beginning / A. Sánchez-alvarado // Cell – 2006.- Vol. 124. – P. 241-245.
 10. Effects of organophosphorus insecticides on *Dugesia tigrina*: Cholinesterase activity and head regeneration / D. Villar, M. González, M. J. Gualda, D. J. Schaeffer // Bull. Environ. Contain. Toxicol. – 1994 – Vol. 52 – P. 319-324
 11. Догель В.А. Зоология беспозвоночных – изд. седьмое переработанное – М: Высшая школа, 1981. – 660 с.
 12. Установа для прижизненной морфометрии регенерации планарий / В.Г. Вишневецкий, М.М. Махонина, Н.А., Демцун, Н.А. Темуриянц // Ученые записки Таврического национального университета им.В.И. Вернадского. Серия «Биология. Химия» - 2007. – Т.20 (59). -№4. – С.18-21
 13. Влияние электромагнитного экранирования различной продолжительности на регенерацию планарий *Dugesia tigrina* / Н.А. Демцун, М.М. Махонина, Н.А. Темуриянц, В.С. Мартынюк // Физика живого. – 2008. - Т.16. -№1.- С. 68-73.
 14. Плеханов Г.Ф. Зависимость реакции биосистемы на раздражитель от ее исходного значения / Г.Ф. Плеханов, Н.В. Васильев, Т.И. Козлова // Бюл. Сиб. отд. АМН СССР. – 1989. – № 2. – С. 83-86.
 15. Sandodze V. Effect of hipomagnetic fields on motility of the ependimal cells in vivo / V. Sandodze, I.K.Swnidze, E.V. Didimona // Radiats Biol.Radioecol.- 1995.- Vol. 1.- P. 19-22.
 16. Truta Z Zero magnetic field influence on in vitro human spermatozoa cells behavior / Z.Truta, S.Neamtu, V.Morariu // Romanian J. Biophys. – 2005. – Vol. 15. – P. 73-79

Демцун Н.О., Темуриянц Н.А., Баранова М.М. Динаміка швидкості руху планарій які регенерують в умовах електромагнітного екранування. // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2009. – Т. 22 (61). – № 1. – С. 24-32.

Розроблена методика визначення швидкості руху планарій. Показано, що швидкість руху як і індекс регенерації в умовах електромагнітного екранування зростає. При тривалому електромагнітному екрануванні швидкість руху зростає в 1,2 разів більше, ніж індекс регенерації. Виявлена висока позитивна кореляція між даними показниками ($r = 0,95$).

Ключові слова: електромагнітне екранування, *Dugesia tigrina*, регенерація, швидкість руху.

Demtsun, N.A., Temuryants N.A., Baranova M.M. Dynamics in the mobility of planaria that are regenerating under the conditions of electromagnetic shielding // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2009. – V.22 (61). – № 1. – P. 24-32.

Based upon the techniques of computer image analysis we have developed a method of calculating the velocity of planaria movement. A strong positive correlation was found between this parameter and the index of regeneration ($r=0.95$). It has been shown that under the conditions of electromagnetic shielding, the velocity of planaria movement increases 1.2 times greater than the index of regeneration.

Key words: electromagnetic shielding, *Dugesia tigrina*, regeneration, movement velocity

Поступила в редакцію 05.04.2009 г.