

УДК 591

РЕГЕНЕРАЦИЯ ГЛОТКИ У ПЛАНАРИЙ¹

© 2009 г. Н. Д. Крещенко

Институт биофизики клетки РАН
142290 Пущино, Московская область
E-mail: nkreshch@rambler.ru

Поступила в редакцию 09.09.07 г.
Окончательный вариант получен 22.03.08 г.

*Посвящаю этот обзор светлой памяти
выдающегося ученого, учителя и наставника,
доброего, внимательного, справедливого человека
Виктора Ивановича Миташова*

Представлен обзор собственных и литературных данных, полученных в процессе изучения регенерации глотки у планарий. Планария может регенерировать из небольшого участка тела, при этом она восстанавливает все недостающие ткани и органы, в том числе и глотку. Глотка является относительно автономным органом, обладающим дифференцированной структурой и специализированной функцией. Регенерация глотки отличается характерными особенностями, и ее изучение представляет значительный теоретический интерес. Регенерация глотки может являться также удобной моделью для исследования молекулярных механизмов регенерационных процессов, которые до сих пор остаются нераскрытыми. Кроме этого модель можно использовать для тестирования биологически активных веществ в попытке выяснить их влияние на процессы морфогенеза. Возможность простого и адекватного анализа, работы с большим числом животных и малым количеством анализируемых веществ является преимуществом этого объекта исследования.

Ключевые слова: планарии, регенерация, глотка, нервная система, нейропептиды.

Высокая регенерационная способность планарий как следствие их морфогенетической пластичности широко известна и изучается с давних пор (Шейман, 1984; Reuter, Kreshchenko, 2004; Salo, 2006). Исследователи изучали главным образом общие закономерности регенерационного процесса. Оказалось, что планарии по-разному проявляют свои способности к регенерации при восстановлении разных структур или частей тела (Шейман и др., 2004). Поэтому выбор органа с дифференцированной структурой и специализированной функцией, каким является глотка, представляет дополнительные возможности для анализа процесса регенерации.

СТРОЕНИЕ ГЛОТКИ

Глотка планарий – это цилиндрической формы мускулистый орган, который лежит в глоточной полости, расположенной приблизительно в середине тела (рис. 1, а, б). Глоточная полость открывается наружу ротовым отверстием, находя-

щимся на брюшной стороне. Полость глотки переходит в полость кишечника, разветвляющегося в теле планарии. Глотка прикрепляется к телу проксимальным (или базальным) участком (рис. 1, в); в этом месте расположены якорные мышцы, удерживающие ее в теле планарии. Сама глотка обладает сложной и хорошо развитой мускулатурой (рис. 1, в–д; 2, а) и, выдвигаясь наружу через ротовое отверстие, совершает движения, обеспечивающие захват и поглощение пищи, а также проталкивание ее в полость кишечника. Глотка участвует в измельчении и частичном переваривании пищи благодаря активности ферментов железистых клеток, протоки которых открываются на ее дистальном конце. Протеолитическая секреция глоточных желез дополняет мышечные усилия при проникновении глотки в пищу, способствует ее расщеплению и облегчает процесс поглощения (Jennings, 1974, 1977). Структура глотки детально изучена на морфологическом, гистологическом и ультраструктурном уровнях (Ishii, 1964, 1966; Welsh, Williams, 1970; Bowen, Ryder, 1973; Gamo, Garsia-Corrales, 1985; Asai, 1991; Bueno et al., 1997). Стенка глотки (рис. 1, в–д) состоит из нескольких слоев: эпителиальных – на-

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 07-04-00452а, 08-04-00271а).

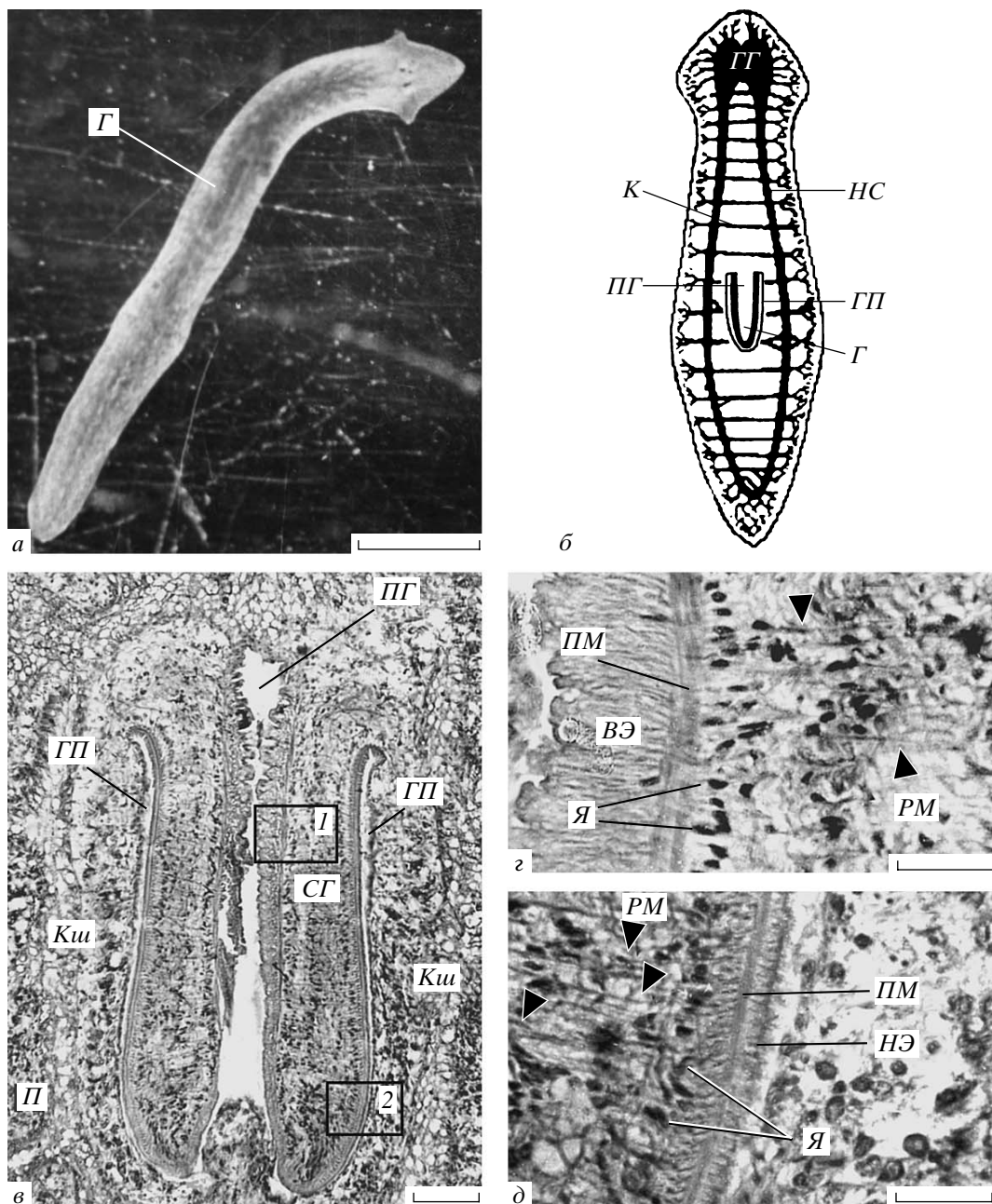


Рис. 1. Планария *Girardia tigrina*: а – общий вид; б – схема расположения глотки в теле; в – глотка, головной конец тела кверху; г, д – строение стенки глотки, увеличение фрагментов 1, 2 на в. Окраска гематоксилином и эозином (в–д) гистологических препаратов толщиной 10–20 мкм. Масштаб: а – 1.8; в – 0.1; г, д – 0.02 мм.

Обозначения: Г – глотка, ГП – глоточная полость, ПГ – полость глотки, СГ – стенка глотки, ГГ – головной ганглий, НС – главные продольные нервные стволы, К – поперечная комиссура, Кш – кишечник, П – паренхима, ПМ – продольная мускулатура, РМ – радиальные мышцы, ВЭ – внутренний эпителий, НЭ – наружный эпителий, Я – ядра клеток.

ружного и внутреннего, мышечных – наружного и внутреннего и срединного паренхимного. Мышечный слой, находящийся под наружным эпителием, состоит из блоков продольных мышечных волокон, разделенных коллагеновым материалом и иногда отростками погруженных эпители-

альных клеток. Под продольными волокнами находятся кольцевые мышечные волокна, пронизанные соединительной тканью и содержащие тела погруженных в них эпителиальных клеток, а также нервные и железистые клетки. В мышечном слое глотки, подстилающем внутренний эпителий, име-

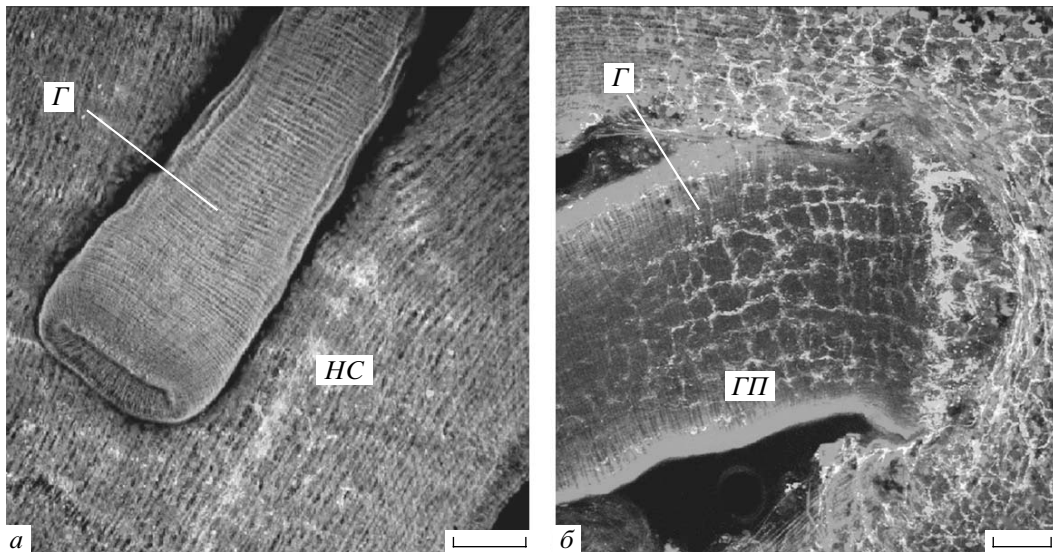


Рис. 2. Суммарное изображение (максимальная проекция) серии оптических срезов, проходящих примерно через 11–20 мкм, интактной глотки: *а* – мышечный цилиндр, *б* – нервный плексус. Иммуноцитохимическая окраска: *а* – TRITC-меченным фаллоидином; *б* – первичными моноклональными антителами к нейропептиду F и вторичными FITC-мечеными иммуноглобулинами. Обозначения см. на рис. 1, масштаб: 100 мкм.

ются кольцевые, продольные и диагональные мышечные волокна. Радиальные мышечные волокна соединяют внутренний и внешний мышечные слои глотки (Bowen, Ryder, 1973). Описаны также особенности мышечных волокон глотки, которые отличаются от таковых тела (MacRae, 1963; Kobayashi et al., 1998; Orii et al., 2002; Sakai et al., 2002).

Между мышечными слоями глотки расположены фиксированные паренхимные, а также нервные, вакуолярные, мерцательные (эксcretорные) клетки и железистые клетки глоточных желез, тела которых располагаются в области основания глотки, а их протоки тянутся к дистальному ее концу, куда выводятся продукты желез (Ishii, 1964; Bowen, Ryder, 1973; Farnesi, Pascolini, 1973; Jennings, 1977; Gamo, Garsia-Corrales, 1985). По данным большинства исследователей, в глотке планарий отсутствуют необласты (стволовые клетки), которые распределены в паренхиме тела планарии (Brøndsted, 1969; Bagañá, 1976; Kishida, Asai, 1980; Sanchez Alvarado, Kang, 2005).

Нервная система глотки относительно автономна, однако анатомически связана с центральной нервной системой, а именно с главными (вентральными) нервными стволами (Joffe, Reuter, 1993; Kreshchenko et al., 1999). Глоточная нервная система представляет собой хорошо развитые внутренние и внешние нервные сплетения (плексусы), располагающиеся под мышечным и эпителиальными слоями (субмышечный и субэпителиальный плексусы соответственно). Обе нервные сети связаны друг с другом радиальными нервами, а также продольными нервными волокнами, образуя правильную решетку (рис. 2, б).

Субэпителиальный нервный плексус формируется окончаниями чувствительных нейронов. Ближе к дистальному концу глотки у разных видов планарий имеется одно или несколько нервных кольцевых утолщений (Pascolini, 1966; Pascolini et al., 1971; Bagañá, Ballester, 1978; Reuter et al., 1996). В нервной системе глотки присутствуют все типы нейронов: сенсорные, моторные и ассоциативные, а внутри нервной сети имеются синаптические контакты. Глотка, выделенная из тела планарии, некоторое время сохраняет способность сокращаться, что обусловлено функционированием внутриглоточных рефлекторных дуг (Hanström, 1926; Bullock, Horridge, 1964).

Гистохимические и иммуноцитохимические исследования обнаружили в нервной системе глотки планарий широкий спектр нейрональных сигнальных молекул, которые содержатся в центральной нервной системе планарий и характерны для высших многоклеточных. Наличие биогенных аминов показано в глоточном нервном кольце у *Dendrocoelum lacteum* (Плотникова, Кузьмина, 1968; Лурье, 1975). У *Dugesia lugubris*, *Vdellocephala punctata*, *Planaria torva* была описана ацетилхолинэстеразная активность (Тирас и др., 1975). Исследования показали присутствие в нервной системе глотки планарий разных видов (*Dugesia dorotocephala*, *Planaria nigra*, *P. torva*, *Dugesia tigrina*, *Procerodes littoralis*) серотонина, катехоламинов и гистамина (Welsh, Williams, 1970; Welsh, King, 1970; Wikgren et al., 1990; Reuter, Eriksson, 1991; Reuter et al., 1995a,b,c; 1996; Mäntylä et al., 1998; Kreshchenko et al., 1999). Серотонинергическая иммунореактивность наблюдалась в глотке

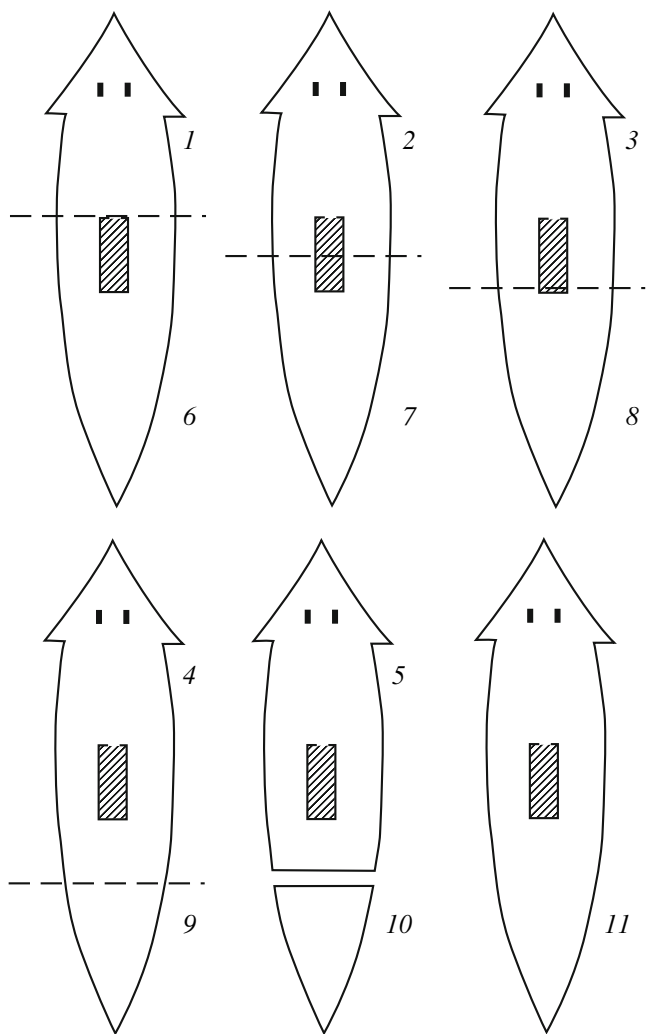


Рис. 3. Схема перерезок, при которых исследовали регенерацию глотки у планарий: 1–5 – головные, 6–9 – хвостовые фрагменты тела; 10 – то же: зооиды, образующиеся при бесполом размножении (делении); 11 – удалена только глотка (▨); по: Крещенко, Шейман, 1999, с изменениями.

планарий в основном во внутреннем цилиндре, а также в волокнах, простирающихся радиально к внешнему цилиндру. На дистальном конце глотки наблюдали кольцо, состоящее из 12 серотониниммунореактивных клеток (Reuter et al., 1996; Kreshchenko et al., 1999). В нервных волокнах и клетках глоточной нервной системы планарий *Girardia tigrina* (синоним *Dugesia tigrina*) выявлен оксид азота (Eriksson, 1996; Gustafsson et al., 1998).

Ряд нейропептидов был обнаружен в нервной системе глотки планарий. Специфический нейропептид плоских червей, гомологичный нейропептиду Y (NPY) позвоночных и названный нейропептидом F (NPF) (Maule et al., 1991), был выделен и охарактеризован у наземной планарии *Artio-posthia triangulata* (синоним *Arthurdendyus triangu-*

latus) (Curry et al., 1992; Dougan et al., 2002). NPF локализован в нейронах центральной и периферической, в том числе и глоточной, нервной системы планарий *D. lacteum*, *D. tigrina*, *Policelis nigra*, *D. lugubris*, *B. candida*, *A. triangulatus*, *P. littoralis* (Gustafsson et al., 2002; Halton, Maule, 2004). У *D. tigrina* NPF-иммунореактивность обнаружена в телах клеток и волокнах, формирующих наружную и внутреннюю глоточную нервную сеть (Reuter et al., 1995a). Другой нейропептид, FMRF-амид, был обнаружен в нервных волокнах глотки у *P. nigra* (Wikgren et al., 1986) и байкальской планарии *Fredmaniella* sp. (Eriksson et al., 1990). В глотке у *B. candida* (Johnston et al., 1996) и *P. torva* (Mäntylä et al., 1998) были описаны нервные клетки и волокна, иммунореактивные к RF- и GYIRF-амиду. GYIRF-амид обнаружен также в глоточной нервной системе интактных и регенерирующих планарий *G. tigrina* (Reuter et al., 1995a; Kreshchenko et al., 1999; Reuter, Kreshchenko, 2004).

РЕГЕНЕРАЦИЯ ГЛОТКИ

Если удалить глотку из тела планарии или отсечь часть тела, в которой глотка отсутствует (предглоточный или хвостовой фрагменты), то в них глотка регенерирует заново. При формировании глотки у планарий происходят процессы, характерные для регенерации: пролиферация стволовых клеток – необластов, аккумуляция недифференцированных клеток, формирование глоточного зачатка, дифференцировка клеток и тканей, рост новой глотки и восстановление ее функции.

При изучении регенерации глотки возникают следующие вопросы: каким образом глотка регенерирует, если ее ткани лишены необластов; происходит ли развитие глотки из бластемы, если таковая образуется, или в старых тканях тела; какой тип клеток участвует в формировании глоточного зачатка; детерминированы ли клетки, формирующие глотку, еще до образования глоточного зачатка или их детерминация происходит позже? В ходе изучения регенерации глотки исследователи пытались ответить на эти вопросы и изучали ее в передних (головных) и задних (хвостовых) фрагментах тела (рис. 3), отсеченных впереди и позади глотки (Tacher, 1902; Stevens, 1907; Steinmann, 1908; Dresden, 1940; van Asperen, 1946; Sengel, 1951; Kido, 1961; Ziller, 1973; Крещенко, Шейман, 1998); в хвостовых фрагментах, отделившихся в ходе бесполого размножения планарий (Shirasawa, Makio, 1991; Reuter et al., 1996; Hori, Kishida, 1998, 2001; Крещенко, Шейман, 1999); после удаления глотки из тела интактной планарии (Крещенко, 1993; Kreshchenko et al., 1999); после отсечения 1/3 дистальной части глотки (Kishida, Asai, 1980; Ito et al., 2001).

Описано несколько вариантов регенерации глотки на морфологическом и гистологическом

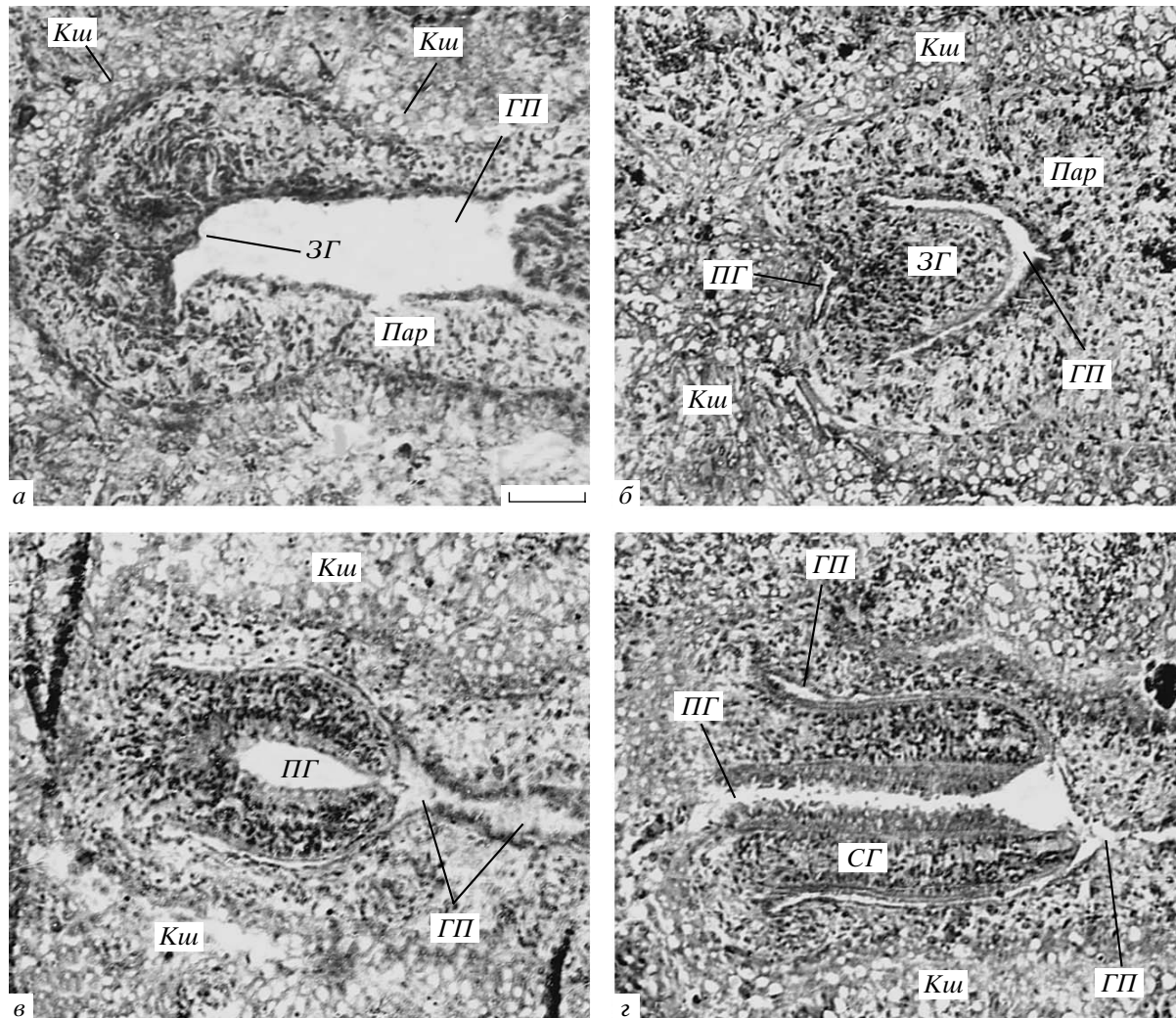


Рис. 4. Регенерация глотки при удалении ее из тела планарии: а-г – 1–4-е сут регенерации соответственно. Окраска гистологических препаратов толщиной 10–20 мкм гематоксилином и эозином. Масштаб: 0,1 мм. ЗГ – зачаток глотки, Пар – паренхима, ост. обозначения см. на рис. 1.

уровнях. Впервые регенерацию глотки у планарий описал Морган (Morgan, 1901), который обнаружил, что у *Planaria maculata* новая глотка регенерировала в передних отсеченных фрагментах тела в образующейся бластеме, а у задних фрагментов – в старой ткани. Течер (Tacher, 1902) на планариях того же вида обнаружила, что формирование новой глотки в передних (рис. 3; 1) и хвостовых фрагментах (рис. 3; 8) происходит сходно, однако в хвостовых фрагментах несколько позже, чем в передних. Так, в передних фрагментах планарий в конце 1-х сут регенерации раневая поверхность покрывалась эпителием, под которым скапливались клетки, образующие регенерационную бластему. Глоточный зачаток формировался в течение 3 сут после операции. В окружающих его тканях находилось много делящихся клеток, мигрирующих к месту образования зачатка глот-

ки. На 3-и сут в передних фрагментах развивалась глоточная камера. В хвостовых фрагментах глоточная камера появлялась на 12 ч позже. На 4-е сут формировалась внутренняя полость глотки, которая соединялась со стенкой пищеварительного тракта и глоточной камерой. Одновременно дифференцировались мышечные слои, вначале в области соединения глотки с телом, а потом в более дистальных областях. Кольцевые мышцы развивались позже продольных. В течение 5–6-х сут в головных фрагментах глоточная камера открывалась наружу ротовым отверстием, после чего животные начинали питаться. Регенеранты, возникшие из хвостовых фрагментов, начинали питаться на 7-е сут после операции. После того как структура глотки сформировалась, все еще продолжалось движение клеток к ее базальной обла-

сти и происходила дифференцировка паренхимной и мышечной тканей (Tacher, 1902).

Дрезден (Dresden, 1940) описал образование глоточного зачатка в задних фрагментах (рис. 3; 6) у *P. nigra*. В течение первых 6 сут клетки накапливались в области, где должна была возникнуть новая глотка. Глоточный зачаток появлялся на 6-е сут регенерации. Он постепенно заполнял старую глоточную камеру, и в нем образовывалась полость глотки, которая соединялась с передней кишечной ветвью. Продолжалось движение клеток из отдаленных областей тела к формирующейся глотке, а сама глотка продолжала расти. К 10–12-м сут основные ткани глотки были дифференцированы, но дифференцировка продольной мускулатуры завершилась только к 18-м сут. Поскольку автор (Dresden, 1940) не обнаружил митозов, то полагал, что формирование регенерационной почки происходило посредством дедифференцировки и миграции клеток тела из отдаленных областей к месту формирования глотки. Согласно другому описанию, в отсеченных хвостовых фрагментах (рис. 3; 8) планарий *P. nigra* регенерационная бластема образуется из скопления недифференцированных клеток и на 6–10-е сут подразделяется на две части: из передней формируется головной конец с нервным ганглием и глазами, а из задней – глоточный зачаток. Затем в тканях тела формируется новая глоточная камера, которая постепенно заполняется растущей глоткой с собственной глоточной полостью, связанной с передней ветвью кишечника (Van Asperen, 1946).

Иное описание регенерации глотки приведено для планарий *Dugesia gonoccephala*. У них глоточная полость (ее называют также глоточной камерой) формируется клетками кишечника, а глоточный зачаток – скоплением необластов. Зачаток глотки заметен спустя 48 ч после отсечения головных и хвостовых фрагментов (рис. 3; 1, 8). К 3–4-м сут регенерации в новой глоточной стенке обнаруживаются тонкие мышечные волокна. Одновременно задний конец глоточной полости вытягивается по направлению к брюшной стенке тела и открывается на брюшной стороне ротовым отверстием (Kido, 1958, 1961).

О разных источниках клеток, формирующих новую глотку, писали и другие авторы. После отсечения (рис. 3; 9) или отделения (рис. 3; 10) хвостовых фрагментов у планарий *Vipalium kevense* (Sirasawa, Makino, 1991) наблюдали, как клетки кишечной стенки мигрировали в паренхиму, где дедифференцировались и принимали участие в формировании новой глотки наряду с необластами, мигрировавшими вдоль нервных стволов в область формирования глотки.

При ампутации 1/3 дистального конца глотки у планарий *Dugesia japonica* была получена дополнительная информация об источнике и сроках

формирования новых глоточных тканей (Kishida, Asai, 1980). Авторы этих работ не обнаружили необластов, а также митотических картин ни в дистальной, ни в проксимальной части глотки вплоть до 5-х сут регенерации. Эпителиальные клетки происходили из старого эпителия и покрывали раневую поверхность отсеченной части глотки, где в течение 2 сут формировалась регенерационная бластема из паренхимных клеток глотки, мигрировавших к отсеченному концу. После 48 ч регенерации в проксимальной части бластемы была заметна дифференцировка наружных мышечных слоев. К 4-м сут глотка удлинялась, отростки железистых клеток достигали к этому времени дистального края глотки, появлялся внутренний кольцевой мышечный слой. К 7–8-м сут протоки железистых клеток открывались на поверхности дистального конца глотки. Способность питаться у большинства червей восстанавливалась через 8–14 сут после операции. С 10-х по 20-е сут структура регенерировавшей глотки приближалась к интактной, но мышечный слой регенерирующей глотки был тоньше по сравнению с нормальным (Kishida, Asai, 1980; Asai, 1991).

Наиболее информативными представляются наблюдения регенерации глотки после полного ее удаления (рис. 3; 11) из тела интактных планарий *D. tigrina* (Крещенко, 1995). В течение первых 24 ч регенерации (рис. 4, а) мелкие базофильные клетки, по морфологическому описанию соответствующие недифференцированным или необластам, аккумуляровались в передней области старой глоточной камеры (или глоточной полости). Это довольно плотное скопление было покрыто тонким слоем эпителия. В течение последующих дней глоточный зачаток увеличивался и “вращал” в старую глоточную камеру. Ко 2-м сут (рис. 4, б) регенерации на проксимальном конце глоточного зачатка формировалась небольшая, треугольной формы внутренняя полость глотки, которая быстро увеличивалась по направлению к дистальному концу формирующейся глотки. К 3-м сут регенерации (рис. 4, в) полость глотки соединялась с полостью глоточной камеры на ее дистальном конце и с полостью кишечника на ее базальном полюсе. К 3–4-м сут регенерации становились различимы продольные и кольцевые мышечные волокна. Внутренний эпителиальный слой глотки не был упорядочен и содержал пузырьвидные клетки с большим количеством цитоплазмы (рис. 4, в, г). Наружный эпителиальный слой, покрывающий глотку, был отчетливо различим на 4–5-е сут регенерации (рис. 4, г), продолжалось добавление новых мышечных волокон в мышечный слой глотки. На 5–7-е сут протоки глоточных желез открывались на дистальном конце глотки. К этому времени структура новой глотки была полностью сформирована, однако ее размеры оставались меньше интактной (см. рис. 1, в) еще в

течение месяца после удаления. Наши собственные гистологические данные указывают на то, что зачаток глотки формировался из недифференцированных клеток (Крещенко, 1995).

Таким образом, авторы ранних исследований регенерации глотки обращали главным образом внимание на ее закладку и местоположение в регенерирующих фрагментах. С помощью классических методов и подходов удалось установить последовательность гистологических событий, происходящих в ходе регенерации глотки, описаны пространственно-временные характеристики дифференцировки глоточных структур (образование зачатка глотки, состоящего из недифференцированных клеток, появления глоточной камеры и внутренней полости глотки, последующее развитие зачатка глотки в зрелую глотку). Были обнаружены различия в сроках и динамике формирования глотки в передних и хвостовых фрагментах планарий. Из данной литературы следует, что способы формирования новой глотки различны у разных видов планарий и могут быть описаны в той или иной степени как эпиморфоз или морфаллаксис. Они проявляют свою наивысшую активность в разное время: вначале происходит формирование регенерационной бластемы возле раневой поверхности (эпиморфоз), позже наблюдается морфаллаксис, во время которого происходит перестраивание старых тканей фрагмента и формируется новый индивидуум. Пропорции тела в регенерирующем фрагменте восстанавливались путем морфаллаксиса, однако только после того, как происходила закладка органа. Обнаружено также, что дифференцировка тканей глотки, а также восстановление ее функции происходят раньше, чем глотка достигнет дефинитивного размера.

Однако гистологические методы не позволяли выделить стволовые клетки – необласты и проследить их дальнейшую судьбу. Элементы клеточной дифференцировки – появление эпителия и мускулатуры – оценивались лишь на основании общих морфологических характеристик. В отсутствие специфических клеточных маркеров на том этапе исследований сохранялось большое количество противоречий. Так, среди клеточных источников регенерации глотки наряду с необластами фигурировали кишечные клетки и железистые клетки глотки, которые, по мнению авторов работ, дедифференцировались, причем, по-видимому, одновременно с пролиферацией стволовых клеток – необластов. Необходимость углубленного изучения регенерации глотки с использованием возможностей современных биологических методов была очевидной.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФУНКЦИИ ГЛОТКИ

Планарии являются хищниками. Голодные особи реализуют комплекс поведенческих реакций, направленных на поиск пищи, захват пищевого объекта и его переваривание. Когда голодных планарий *D. tigrina* кормили мотылем, они начинали двигаться по дну сосуда, приближаясь к жертве. Это поведение, направленное на поиск пищи, было названо реакцией приближения к жертве. Затем они выдвигали глотку и засасывали пищу. Этот процесс был назван двигательной пищевой реакцией глотки. Большинство оперированных животных восстанавливали способность поглощать пищу на 5–8-е сут регенерации, что свидетельствовало о согласованном функционировании мышечной и нервной систем, а также глоточных желез (Крещенко, 1993; Шейман и др., 2002). У некоторых планарий, размножающихся половым путем, регенерация глотки в головных фрагментах, отсеченных впереди глотки, происходила быстрее, чем в хвостовых (Tacher, 1902; Steinmann, 1908). В отделившихся при бесполом размножении хвостовых фрагментах (дочерних зооидах) глотка регенерировала быстрее, чем в отсеченных на том же уровне хвостовых фрагментах (Крещенко, Шейман, 1999). При рассечении тела планарии на примерно три равные части – переднюю, окологлоточную и хвостовую – глотка регенерировала наиболее интенсивно в окологлоточном фрагменте, затем в хвостовом и более медленно – в головном. Если разрез проходил через середину окологлоточной области планарии, функциональная регенерация глотки происходила значительно быстрее в головных фрагментах тела, содержащих переднюю часть окологлоточной области или зону прикрепления глотки к телу планарии, по сравнению с хвостовыми фрагментами, которые имели только заднюю часть окологлоточной области (Крещенко, Шейман, 1998). Таким образом, было обнаружено, что сроки восстановления пищевой реакции новой глотки зависели от вида планарии, способа размножения (полового и/или бесполого), а также от уровня отсечения фрагмента (головного, окологлоточного, хвостового) и его размера.

РОСТ ГЛОТКИ

Некоторые исследователи отмечали, что регенерировавшая и уже функционирующая глотка не достигала размеров интактной. Так, длина глоток у *D. lugubris* через 15 сут с момента ампутации, измеренная на гистологических препаратах, составляла лишь 62% длины глоток интактных животных (Pascolini, 1966). У планарий *D. tigrina* восстановление функции вновь сформированной глотки происходило на 5–8-е сут после ее удаления. В это время структура новой глотки соответствовала интактной, однако новая глотка была

меньше. Прижизненные морфометрические измерения на одних и тех же животных показали, что глотка продолжала расти в течение месяца после удаления. Наибольшая скорость роста была отмечена с 7-х по 14-е сут регенерации. Удлинение глотки и утолщение глоточной стенки происходили независимо друг от друга. Новая глотка достигала исходной длины к 21-м сут, а ее площадь – к 28-м сут регенерации. Таким образом, завершающим этапом регенерации глотки являлось восстановление исходных размеров, характерных для планарий, когда происходило увеличение всех параметров: длины, толщины и площади регенерирующей глотки (Крещенко, 1993).

НЕРВНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ГЛОТКИ

Эксперименты по трансплантации различных участков тела планарий-доноров в разные зоны тела планарий-реципиентов обнаружили существование индукционных механизмов при формировании глотки. Ведущая роль в индукции регенерации глотки отводилась центральной нервной системе (Wolf, 1962; Lender, 1962; Шейман, 1984; Kishida, 1986; Шейман, Крещенко, 1995). Так, пересадка головного ганглия в заглоточную область у *D. tigrina* и *P. dorotocephala* индуцировала там формирование одной или двух дополнительных нормально функционирующих глоток (Santos, 1929, 1931). У *Planaria gonosephala* пересадка головного участка в заглоточную и глоточную области вызывала формирование дополнительной глотки (Sugino, 1938). Было высказано мнение, что пересаженный головной фрагмент индуцирует появление глоточной зоны, а затем глоточная зона в свою очередь индуцирует формирование глотки. При отсечении переднего конца тела у планарий первым начинал дифференцироваться мозг, затем формировалась предглоточная область, которая стимулировала развитие позади глоточной зоны. Предполагалось, что и глоточная зона в свою очередь выделяла индукторы для формирования глотки (Sengel, 1953; Wolff, 1962).

При трансплантации головного фрагмента в заглоточную область у планарий *D. japonica* также образовывались дополнительные глотки. Однако их появление наблюдали и при трансплантации предглоточного участка в заглоточную область тела (Asai, 1981; Asai, Kishida, 1985). Таким образом, предглоточный участок тела, так же как и головной, был способен индуцировать формирование глотки у планарий (Okada, Sugino, 1934a,b; 1937; Okada, Kido, 1943). Образование дополнительной глотки происходило и при рассечении обоих нервных стволов в предглоточной области тела планарий (Schilt, 1972; Kishida, Nacagiri, 1982; Kishida, Asai, 1984; Kishida, 1986). Некоторые авторы полагали, что нервные стволы могли осу-

ществлять в процессе регенерации трофическую функцию (Kishida, Asai, 1984).

У планарий *D. lugubris* после предварительного удаления головы (за 10–12 сут до удаления глотки) регенерация глотки тормозилась (Liotti, Bruschelli, 1966). При одновременном удалении головного конца тела и глотки у *D. tigrina* регенерация задерживалась на 1 сут примерно у 15% животных. Удаление нервных стволов в предглоточных фрагментах планарий задерживало регенерацию глотки на 2 сут по сравнению с контрольной группой животных, у которых нервные стволы были сохранены. Это позволило предположить, что влияние нервных стволов на регенерацию глотки значительно сильнее влияния головного ганглия (Шейман, Крещенко, 1995).

Таким образом, при использовании разных видов планарий и исследовании разных воздействий (удаление нервных стволов или головного ганглия, их трансплантация в другую область тела, введение гомогенатов и экстрактов головного мозга) было показано, что головной ганглий и нервные стволы играют важную роль в индукции регенерации глотки, они также необходимы как для успешного прохождения процесса регенерации глотки, так и для связанного с ним пищевого поведения. Предполагается, что во взаимодействии между нервной системой и регенерантом участвуют факторы, продуцируемые нейросекреторными клетками, химическая природа которых остается неизвестной.

ХИМИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ГЛОТКИ

Одной из классических проблем биологии развития является химическая регуляция морфогенеза. Многочисленные специальные исследования позволили предполагать существование у планарий факторов регенерации – определенных морфогенетических агентов, регулирующих процессы развития, регенерации и бесполого размножения (Pascolini, 1966; Ziller-Sengel, 1967a,b; Pascolini, 1970; Шейман, 1984; Шейман и др., 1989; Reuter, Kreshchenko, 2004).

В отношении изучения факторов, влияющих на регенерацию глотки, использовали те же подходы и приемы, что и при исследовании регуляции процесса регенерации у планарий вообще. Так, применение гомогенатов или экстрактов тканей определенных частей тела явилось первым шагом для обнаружения таких факторов. Их вводили в организм планарий с помощью инъекций, а также скармливая с пищей или добавляя в среду, в которой они содержались. У *D. lugubris*, *D. tigrina* и *P. nigra* очищенный экстракт тканей головной зоны тела существенно ускорял регенерацию глотки. На 8-е сут регенерации при воздей-

ствии на планарий экстрактов из тканей головной области тела глотка регенерировала у 80% особей, тогда как при воздействии экстрактов из окологлоточной области – у 21% животных. Из этого были сделаны выводы о том, что головная зона содержит фактор (или группу факторов), стимулирующих регенерацию глотки (Ziller-Sengel, 1965).

При изучении влияния гомогенатов глоточных областей на регенерацию глотки были получены противоречивые сведения. Сначала было обнаружено, что гомогенаты окологлоточной области планарий оказывают тормозящее действие на регенерацию глотки, которое особенно ярко выражено на 10–15-е сут. Это дало основание предполагать, что глотка или совместно глотка и окологлоточная зона выделяют специфический ингибитор, роль которого состоит в предотвращении формирования дополнительных глоток (Wolff et al., 1964). Добавление в воду, в которой содержались планарии *D. gonosephala* бесполой расы, экстрактов глоток и/или тканей, окружающих глотку, не оказывало существенного влияния на регенерацию глотки после ее удаления, в то время как у этих же животных, размножающихся половым путем, экстракт окологлоточных тканей сильно тормозил регенерацию (Ziller-Sengel, 1967b). У планарий *P. nigra* и *D. tigrina* экстракты окологлоточных тканей также подавляли регенерацию глотки (Ziller-Sengel, 1965; 1967a,b). У планарий *D. lugubris* добавление в воду гомогенатов глоток и глоточных областей приводило к подавлению регенерации глотки (Pascolini, 1966), а при инъекции в область глотки регенерирующих планарий нескольких мм³ гомогената тканей глотки происходило увеличение длины регенерирующей глотки. Автор сделала вывод о стимулирующем влиянии тканей глотки на ее регенерацию, который был подтвержден в следующем эксперименте, где регенерация глоток у двухглоточных планарий также ускорялась при добавлении в воду экстракта глоток (Pascolini, 1970).

У *D. tigrina* бесполой расы было выявлено, что регенерация глотки тормозилась у планарий-реципиентов при поедании гомогенатов окологлоточных областей и глоток, взятых у интактных планарий-доноров. Так же тормозили регенерацию глотки гомогенаты регенерирующих окологлоточных областей, взятые на 1, 2 и 5-е сут регенерации у планарий-доноров (Крещенко, Шейман, неопубл. данные). Таким образом, воздействие полных или частично очищенных гомогенатов различных областей тела на регенерацию зависит от способа их введения, видовой принадлежности особи, а также от способа размножения планарий. Однако, несмотря на некоторые наблюдаемые противоречия, полученные данные в целом свидетельствуют о тормозящем влиянии экстрактов окологлоточных

тканей и о стимулирующем влиянии гомогенатов тканей глотки, а также головной части тела планарий на регенерацию глотки.

Регенерация глотки у планарий *D. tigrina* была использована также для характеристики морфогенетической активности ряда нейропептидов. Например, субстанция Р стимулировала пролиферацию клеток и формирование бластемы, а также развитие глотки у планарий (Saló, Vaguñà, 1986; Vaguñà et al., 1989). При оценке морфологических и функциональных показателей регенерации глотки наиболее выраженный эффект проявляли морфоген гидры и фрагмент люлиберина (1–2), которые стимулировали регенерацию и рост новой глотки (Крещенко, Шейман, 1994). Даларгин тормозил восстановление функции глотки и ее рост в начальный период регенерации (5–7-е сут), аналог фрагмента (8–10)АКТГ задерживал функциональное созревание глотки. Слабое стимулирующее влияние на процесс регенерации оказывали люлиберин, его фрагмент (9–10) и аналог фрагмента (4–10)АКТГ (Крещенко, Шейман, 1994). Обнаружено также, что восстановление функции глотки ускорялось в головных фрагментах тела под воздействием нейропептида F и FMRF-амида (Kreshchenko et al., 2001).

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ИЗУЧЕНИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ГЛОТКИ У ПЛАНАРИЙ

Важным этапом у регенерирующих планарий является экспрессия определенных генов, продукты которых являются транскрипционными факторами и известны как регуляторы ключевых этапов формирования плана строения в развитии животных различных систематических групп. Их изучение у планарий может служить одним из наиболее эффективных путей к пониманию регуляции регенерационных процессов у этих животных. Многочисленные сведения о них приведены в недавних обзорах (Saló, Vaguñà, 2002; Agata, 2003; Sanchez Alvarado, Kang, 2005; Reddien et al., 2005; Saló, 2006) и не являются предметом данной публикации. Мы хотели обратить особое внимание лишь на использование современных методов и подходов к изучению регенерации глотки у планарий и на некоторые сведения, полученные с их помощью.

Работы, проведенные с применением классических гистологических методов, не позволили однозначно ответить на вопрос о клеточных источниках регенерации глотки. Механизмы регуляции компонентов регенерационного процесса, как то: пролиферация необластов и их последующая дифференцировка в нервные, мышечные

или эпителиальные клетки, – оставались малоизученными или неизвестными. Современные иммуноцитохимический и молекулярно-биологический подходы дали возможность получить дополнительные сведения о регенерации глотки у планарий.

Показано, что некоторые гены начинают экспрессироваться на ранних стадиях регенерации глотки. Так, у *D. japonica*, у которой возможна смена половой и бесполой форм размножения, после отсечения хвостовых фрагментов на предглоточном и заглоточном уровнях тела через 1 сут наблюдали скопления клеток, экспрессирующих гены *DjvlgA* и *DjvlgB* (*Dugesia japonica vasa-like gene A, B*). У других организмов, например у дрозофилы, продукты этих генов (*vas*-подобные белки) в комплексе с РНК известны как компоненты гранул, характерных для клеток половой линии, и необходимы для их дифференцировки. У планарий на 2-е сут число *DjvlgA*-положительных клеток увеличивалось в развивающейся бластеме и регенерирующей глотке. На 3-и сут регенерации число этих клеток начинало уменьшаться, а к 7-м сут распределение *DjvlgA* возвращалось к исходному (Shibata et al., 1999). Результаты свидетельствуют о том, что продукт гена *DjvlgA* является компонентом хроматоидных тел (*chromatoid bodies*; Hori, 1982), которые присутствуют в необластах планарий и вовлечены в процесс регенерации хвостового фрагмента (Shibata et al., 1999).

Группа *FoxA*-подобных генов разных организмов относится к транскрипционным факторам, контролирующим процессы клеточной пролиферации и дифференцировки как в раннем эмбриогенезе, так и в процессе органогенеза. У интактных планарий *D. japonica* был обнаружен ген *DjFoxA* (*Dugesia japonica Forkhead box A*), который специфически экспрессировался в клетках, окружающих глотку в центральной части тела. Во время регенерации передних и хвостовых фрагментов планарий *DjFoxA*-положительные клетки появлялись в паренхиме и мигрировали к срединной линии тела, к месту образования новой глотки. На 3-и сут после ампутации *DjFoxA*-положительные клетки были локализованы в центре фрагмента, формируя глоточный зачаток. Это свидетельствует о том, что клетки, экспрессирующие ген *DjFoxA*, вовлечены в ранние стадии формирования глоточно-зачатка (Koinuma et al., 2000).

В ходе регенерации дистального конца глотки, ампутированного у планарий *D. japonica*, в качестве маркера пролиферации использовали ген *DjPCNA* (*Dugesia japonica proliferating cell nuclear antigen*), экспрессия которого зависит от фазы клеточного цикла и является наивысшей в поздней *G*₁- и *S*-фазах. В ходе исследования несколько

DjPCNA-положительных клеток были обнаружены в интактной глотке, что указывает на присутствие ДНК-синтезирующих необластов и/или митозов в глоточной ткани. Это пока единственное сообщение (Ito et al., 2001) о наличии необластов в тканях глотки. В ходе регенерации *DjPCNA*-положительные клетки из мезенхимы тела (в основном из области впереди от основания глотки) мигрировали через основание глотки к ее дистальному концу и участвовали в формировании бластемы. Клетки, скапливающиеся на раневой поверхности глотки, спустя 1 сут после ампутации были слабо окрашены *DjPCNA*-антителами, значит, они дифференцируются после клеточного деления. Авторы сделали вывод о том, что регенерация дистальной части глотки происходит путем эпиморфоза, т.е. вследствие образования регенерационной бластемы из недифференцированных клеток (Ito et al., 2001).

Результаты иммуноцитохимических исследований помогли выявить происхождение клеток и динамику дифференцировки тканей глотки. Следует отметить, что эти данные получены разными авторами на разных видах планарий и при разных условиях проведения операций.

Энтелиий. В хвостовых фрагментах планарий *Phagocata vivida*, регенерирующих глотку, при обработке их моноклональными антителами против антигенов фагоцитарных клеток кишечника обнаружена иммунореактивность внутреннего эпителиального слоя базальной части дифференцирующейся глотки. Это, по мнению авторов, указывает на гастродермальное происхождение внутренних эпителиальных клеток новой глотки (Onodera et al., 1992).

У планарий *Dugesia* (синоним *Girardia tigrina*) в ходе регенерации хвостового фрагмента моноклональные антитела ТСЕН-49 маркировали центральный район тела и появление окологлоточной и глоточной областей тела. ТСЕН-49-иммунорезистивные клетки появлялись на 2-е сут регенерации (Bueno et al., 1995a). Эпителиальные клетки, выстилающие глоточную полость и меченные с помощью антител ТСАВ-1, появлялись на 4–5-е сут. Их число увеличивалось в проксимодистальном направлении. С помощью моноклональных антител ТФ-26, специфичных для железистых клеток, первые клетки глоточных желез были обнаружены только через 7.5 сут на дистальном конце глотки. Они появлялись в новой глотке в проксимодистальном направлении. К 11–12-м сут секреторные клетки восстанавливали типичную для зрелой глотки структуру (Bueno et al., 1995a, b; 1997).

Мышцы. В хвостовых фрагментах *D. tigrina* на 4-е сут регенерации первыми в глоточном зачат-

ке появлялись миобласты, меченные антителами TMUS-13, специфичными для мышечных клеток глотки. Эти клетки были непохожи на зрелые мышечные клетки и напоминали необласты, их дифференцировка происходила в радиальном направлении. Типичная морфология зрелых мышечных клеток восстанавливалась к 9-м сут (Viepo et al., 1995b; 1997). Развитие мускулатуры регенерирующей глотки на 1–7-е сут после удаления из тела изучали с помощью окраски TRITC-меченным фаллоидином, специфически связывающимся с актином миофиламентов. Было показано, что развитие мышечных волокон следовало в проксимодистальном направлении с последующим интеркалярным добавлением новых волокон (Kreshchenko et al., 1999). В паренхиме интактных глоток у планарий *G. tigrina* наблюдали начальную дифференцировку необластов в миоциты, а затем и в зрелые мышечные волокна (Cebria et al., 1999). В этих клетках, находящихся на ранней стадии дифференцировки и сохраняющих морфологические признаки необластов, была обнаружена транскрипция гена и белок тяжелой цепи миозина, специфичные для глоточных мышечных клеток, – *mhc-A* (*myosin heavy chain*). Ряд дифференцирующихся миоцитов, равномерно распределенных по всей длине, был обнаружен исключительно в глотке, но ни одного миоцита не было выявлено в паренхиме зоны прикрепления глотки. Эти наблюдения указывают на то, что необласты проникали в глотку, в ее основание, а начинали дифференцироваться в миоциты уже в глотке. Обновление мышечных клеток происходило за счет интеркалярного роста, когда новые мышечные волокна появлялись между более старыми. Однако вопрос о том, как необласты, поступающие из паренхимы тела, детерминировали в мышечные клетки глотки, остался невыясненным (Cebria et al., 1999).

В ходе регенерации глотки в головных и хвостовых фрагментах *D. japonica* исследовали появление экспрессии гена *DjMHC-A*, кодирующего белок тяжелой цепи миозина и используемого в качестве маркера, специфичного для мышечных клеток глотки. Через 1–1.5 сут в центральной области фрагмента было обнаружено несколько *DjMHC-A*-положительных клеток. Складывалось впечатление, что эти клетки мигрировали в образующийся глоточный зачаток и участвовали в ее регенерации. По мнению авторов (Kobayashi et al., 1999), *DjMHC-A*-положительные клетки могут быть детерминированы к развитию глоточных мышечных клеток еще в паренхиме тела планарий. В этих клетках происходит транскрипция гена *DjMHC-A*, но его трансляция задерживается до формирования глоточного зачатка. На 2–3.5-е сут регенерации происходило увеличение *DjMHC-A*-иммунопозитивных клеток в глоточном зачатке. В

другой работе (Sakai et al., 2002) при изучении ранних событий в ходе регенерации глотки в хвостовых фрагментах *D. japonica* *DjMHC-A* также использовали в качестве маркера клеток глотки и исследовали распределение мышечных клеток с помощью гибридизации и иммуноцитохимии *in situ*. В результате неожиданно были получены противоположные результаты. Было обнаружено, что глоточный зачаток формировался из недифференцированных клеток, происходящих из необластов. Дифференцировка мышечных клеток глотки была тесно связана с таковой якорных мышц в окологлоточной области, месте прикрепления глотки, и эти клетки тоже экспрессировали *DjMHC-A*. Более того, клетки глоточного зачатка, содержащие мРНК и белок – продукты гена *DjMHC-A*, удлинялись начиная со 2-х сут регенерации, приобретая типичную для мышечных клеток морфологию.

Нервная система. Дифференцировку нервных элементов глотки планарий исследовали с помощью моноклональных антител к биогенному амину, серотонину и специфическим нейропептидам плоских червей *GYIRF* и *NPF*. Симметрично расположенные серотониноиммунореактивные клетки появлялись на 4-е сут регенерации в дистальной части формирующейся глотки у хвостовых зооидов *G. tigrina*, отделившихся в ходе бесполого размножения (Reuter et al., 1996). Во время регенерации глотки у *G. tigrina* после ее удаления из тела серотонинпозитивные тела клеток появлялись на 3-и сут на дистальном конце глотки. Наблюдение показало, что развитие серотонинергических нервных элементов глотки происходило в дистопроксимальном направлении, в то время как развитие пептидергических элементов (*GYIRF*) происходило в проксимодистальном направлении и отростки *GYIRF*-положительных клеток прорастали в глотку из области ее основания. При этом одновременно дифференцировались тела *GYIRF*-иммунопозитивных нейронов, расположенных по всей длине глотки (Kreshchenko et al., 1999). *NPF*-иммунореактивные волокна и тела клеток наблюдали в окружении формирующегося глоточного зачатка на ранних стадиях регенерации, что могло указывать на регуляторную роль данного нейропептида *NPF* в регенерации глотки (Kreshchenko, 2008). Таким образом, с помощью молекулярно-генетических методов был выявлен ряд генов, в ходе регенерации глотки у планарий экспрессирующихся специфически (*DjvlgA*, *DjMHC-A*, *DjFoxA*, *DjPCNA*). При использовании специфических моноклональных антител (mAbs) к антигенам определенных специализированных клеток, а также специфических белков, экспрессирующихся на разных стадиях дифференцировки, была получена информация, которая позволила по-новому взглянуть на анатомию, гистологию и механизм формо-

образования во время процессов роста, развития, регенерации планарий. Моноклональные антитела обладают рядом преимуществ по сравнению с классическими гистологическими красителями: они более чувствительны и специфичны, что позволяет определить небольшие различия между внешне почти идентичными клетками. Они могут также служить в качестве маркеров ранней детерминации и дифференцировки, так как позволяют определить и охарактеризовать топографически ограниченные антигены и визуализировать структуру или клеточный тип еще до того, как ее/его морфологические черты станут очевидными. С помощью иммуноцитохимии удалось наблюдать более ранние стадии дифференцировки глотки в ходе ее регенерации и изменить представления о динамике происходящих процессов. Предложена эпиморфно-морфаллактическая модель регенерации глотки (Reuter et al., 1996; Bueno et al., 1997; Serbia et al., 1999; Kreshchenko et al., 1999). Подавляющее большинство иммуноцитохимических исследований свидетельствуют о том, что разные типы клеток (мышечные, эпителиальные и железистые) возникают *de novo* из недифференцированных стволовых клеток планарий – необластов. Однако закладка, дифференцировка и созревание разных типов ткани – мускулатуры, эпителия, нервной системы, глоточных желез – происходит по-разному, в разное время и соответственно их специфичности. Так, стало понятно, что первые признаки дифференцировки мышечных клеток наблюдаются в глотке уже через 1–1.5 сут регенерации, а признаки эпителиальных и нервных клеток – на 2-е и 2–3-и сут соответственно, т.е. гораздо раньше, чем предполагалось. В ходе формирования глоточного зачатка процесс пролиферации стволовых клеток (и образования скопления клеток или глоточного зачатка) предшествует клеточной дифференцировке на очень ранней стадии, однако затем оба процесса проходят параллельно. В глоточном зачатке соседствуют клетки разных типов и разной стадии дифференцировки, последняя происходит одновременно, но по-разному для разных типов клеток: в проксимодистальном (эпителиальные, мышечные клетки, пептидергические нейроны), дистопроксимальном (серотонинергические нейроны), а также в радиальном (мышечные клетки) направлениях. Проведенные исследования, однако, не выяснили, детерминированы ли необласты к образованию глотки уже в паренхиме тела (откуда они поступают) или после образования глоточного зачатка. Сведения о регенерации глотки все еще остаются неполными и отрывочными, поэтому необходимы дополнительные исследования.

В заключение хотелось бы отметить, что глотка хорошо регенерирует у разных видов планарий

как после ее удаления, так и в участках тела, лишенных глоточной области. Сроки ее восстановления являются специфичными для разных видов планарий и отражают степень их регенерационной способности. Наиболее интенсивно регенерация глотки происходит при ее удалении из тела планарии и сохранении окологлоточной области тела, а также во фрагментах тела, содержащих переднюю часть окологлоточной области. Зона прикрепления глотки к телу планарии, или якорная зона, является областью инициации глоточной регенерации. Подобный процесс в передних и хвостовых отсеченных фрагментах тела происходит медленнее, чем после удаления глотки из тела планарии, так как в первом случае происходит не только регенерация глотки, но и восстановление комплекса органов, составляющих недостающую часть тела – головного ганглия, пищеварительной и репродуктивной системы. Формирование новой глотки в отсеченных фрагментах планарий определяется местом регенерации, а также соотношением эпиморфоза и морфаллаксиса. В процессе регенерации глотки можно выделить следующие этапы: формирование бластемы и глоточного зачатка, восстановление первичной морфологической структуры, восстановление функции и дефинитивного размера, характерного для зрелой глотки. По мнению большинства современных исследователей, в ходе регенерации дистальной части глотки, а также после ее удаления из тела источником регенерации служат стволовые тотипотентные клетки – необласты, формирующие регенерационную бластему в головных и хвостовых фрагментах. И, наконец, регенерация глотки регулируется посредством эндогенных (клеточных и химических) взаимодействий, природа которых до конца не выяснена. Применение новых молекулярных и генетических методов исследований, возможности мечения клеток, использование подходов, способных инактивировать нормальную функцию нескольких генов (иРНК), обновили интерес к использованию планарий в качестве модельного организма для изучения закономерностей регенерации.

Автор выражает искреннюю признательность И.М. Шейман за ценные замечания, высказанные при подготовке статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Крещенко Н.Д. Регенерация глотки у планарий *Dugesia tigrina* // Онтогенез. 1993. Т. 24. № 1. С. 66–71.

Крещенко Н.Д. Регенерация глотки у планарий *Dugesia tigrina* и ее регуляция: Автореф. ... дис. канд. биол. наук. М.: ИБР РАН, 1995. 16 с.

- Крещенко Н.Д., Шейман И.М. Регенерация глотки у планарий. Влияние нейропептидов // Онтогенез. 1994. Т. 25. № 4. С. 60–67.
- Крещенко Н.Д., Шейман И.М. Роль окологлоточной области в регенерации глотки у планарий *Dugesia tigrina* // Там же. 1998. Т. 29. № 3. С. 181–187.
- Крещенко Н.Д., Шейман И.М. Исследование морфогенетической активности в хвостовой зоне у планарий *Dugesia tigrina* // Там же. 1999. Т. 30. № 4. С. 307–312.
- Лурье Б.Л. Моноаминсодержащие нейроны планарии *Polycelis nigra* // Вестн. МГУ. Сер. биол. 1975. № 2. С. 3–13.
- Плотникова С.И., Кузьмина Л.В. Распределение нервных элементов, содержащих биогенные амины, у представителя плоских червей – молочно-белой планарии *Dendrocoelum lacteum* // Физиология и биохимия беспозвоночных. Л.: Наука, 1968. С. 23–29.
- Тирас Х.П., Шейман И.М., Сахарова Н.Ю. Активность АХЭ в нервной системе некоторых триклаид (класс ресничных червей) // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1975. Т. 11. № 4. С. 427–429.
- Шейман И.М. Регуляторы морфогенеза и их адаптивная роль. М.: Наука, 1984. 174 с.
- Шейман И.М., Тирас Х.П., Балобанова Э.Ф. Морфогенетическая функция нейропептидов // Физиол. журн. 1989. Т. 75. № 5. С. 619–626.
- Шейман И.М., Крещенко Н.Д. Регенерация глотки у планарий. Влияние нервной системы // Онтогенез. 1995. Т. 26. № 3. С. 231–235.
- Шейман И.М., Зубина Е.В., Крещенко Н.Д. Регуляция пищевого поведения планарий *Dugesia (Girardia) tigrina* // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2002. Т. 38. № 43. С. 322–325.
- Шейман И.М., Крещенко Н.Д., Седельников З.В., Грозный А.В. Морфогенез у планарий *Dugesia tigrina* // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 4. С. 285–290.
- Agata K. Regeneration and gene regulation in planarians // Cur. Opin. Gen. Devel. 2003. V. 13. P. 492–496.
- Asai E. Cell source of a new pharynx induced by head graft in the freshwater planarian *Dugesia japonica japonica* // Zool. Mag. 1981. V. 90. P. 301–305.
- Asai E. Regeneration of the pharynx in the fresh water planarian: an electron-microscopic study with special reference to the formation of the pharyngeal lumen // Zool. Sci. 1991. V. 8. P. 775–784.
- Asai E., Kishida I. Induction of pharynx by nerve-cordless prepharyngeal tissue graft in planaria // Ibid. 1985. V. 2. P. 505–512.
- Baguñà J. Mitosis in intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranean*. I. Mitotic studies during growth, feeding and starvation // J. Exp. Zool. 1976. V. 195. P. 53–64.
- Baguñà J., Ballester R. The nervous system in Planarians: peripheral and gastrodermal plexuses, pharynx innervation, and the relationship between central nervous system structure and the acoelomate organization // J. Morph. 1978. V. 155. P. 237–252.
- Baguñà J., Saló E., Romero R. Effects of activators and antagonists of the neuropeptides substance P and substance K on cell proliferation in planarians // Int. J. Devel. Biol. 1989. V. 33. P. 261–264.
- Bowen I.D., Ryder T.A. The fine structure of the planarian *Polycelis tenuis* Ijima. 1. The pharynx // Protoplasma. 1973. V. 78. P. 223–241.
- Brønsted H.V. Planarian regeneration. Oxford; L.: Pergamon Press, 1969. 267 p.
- Bueno D., Batle E., Soriano M.A. et al. TCAV-1, a monoclonal antibody specific to epithelial pharyngeal cells in the planarian *Dugesia (Girardia) tigrina*. Application to pattern formation of the pharynx during regeneration // Hydrobiologia. 1995a. V. 305. P. 263–264.
- Bueno D., Espinosa L., Soriano M.A. et al. TCEN-49, a monoclonal antibody that identifies a central body antigen in the planarian *Dugesia (Girardia) tigrina*. Implication for pattern formation and positional signalling mechanisms // Ibid. 1995b. V. 305. P. 235–240.
- Bueno D., Espinosa L., Baguñà J., Romero R. Planarian pharynx regeneration in regenerating tail fragments monitored with cell-specific monoclonal antibodies // Devel. Genes Evol. 1997. V. 206. P. 425–434.
- Bullock T.H., Horridge G.A. Structure and function in the nervous systems of invertebrates. V. 1–2. San Francisco; L.: Freeman W.H., 1964. 1719 p.
- Cebria F., Bueno D., Reigada S., Romero R. Intercalary muscle cell renewal in planarian pharynx // Devel. Genes Evol. 1999. V. 209. P. 249–53.
- Curry W.J., Shaw C., Jonston C.F. et al. Neuropeptide F: primary structure from the Turbellarian, *Artioposthia triangulata* // Comp. Biochem. Physiol. 1992. V. 110 C. № 2. P. 269–274.
- Dougan P.M., Mair G.R., Halton D.W. et al. Gene organization and expression of a neuropeptide Y homolog from the land planarian *Arthurdendylus triangulatus* // J. Comp. Neurol. 2002. V. 454. P. 58–64.
- Dresden Jr. D. Pharynx regeneration in *Polycelis nigra* // Acta Neerl. Morphol. 1940. V. 3. P. 140–150.
- Eriksson K.S. Nitric oxide synthase in the pharynx of the planarian *Dugesia tigrina* // Cell Tiss. Res. 1996. V. 286. P. 407–410.
- Eriksson K.S., Timoshkin O., Reuter M. Neuroactive substances in endemic flatworm Lake Baikal // Acta Acad. Abo. Ser. B. 1990. V. 50. № 7. P. 137–145.
- Farnesi R.M., Pascolini R. Investigation on the ultrastructure of the pharyngeal glands in *Dugesia lugubris* // Boll. Zool. Ital. 1973. V. 40. P. 137–147.
- Gamo J., Garcia-Corrales P. The ultrastructure of the pharyngeal gland cells of the freshwater planarian *Dugesia gonocephala* // J. Submicrosc. Cytol. 1985. V. 17. P. 621–630.
- Gustafsson M.K.S., Lindholm A., Mäntylä K. et al. NO news on the flatworm front. Nitric oxide synthase in parasitic and free-living flatworm // Hydrobiologia. 1998. V. 383. P. 161–166.
- Gustafsson M.K.S., Halton D.W., Maule A.G. et al. Neuropeptides in flatworms // Peptides. 2002. V. 23. P. 2053–2061.
- Halton D.W., Maule A.G. Flatworm nerve-muscle: structural and functional analysis // Can. J. Zool. 2004. V. 82. P. 316–333.

- Hanström B.* Über den feineren Bau des Nervensystems der Tricladeiden *Turbellarien* auf Grund von Untersuchungen an *Bdelloura candida* // *Acta Zool.* 1926. V. 7. P. 101–115.
- Hori I.* An ultrastructural study of the chromatoid body in planarian regenerative cells // *J. Electron. Microsc.* 1982. V. 31. P. 63–72.
- Hori I., Kishida Y.* A fine structural study of regeneration after fission in the planarian *Dugesia japonica* // *Hydrobiologia.* 1998. V. 38. P. 131–136.
- Hori I., Kishida Y.* Further observation on the early regenerates after fission in the planarian *Dugesia japonica* // *Belg. J. Zool.* 2001. V. 311. P. 117–121.
- Ishii S.* The ultrastructure of the outer epithelium of the planarian pharynx // *Fukushima J. Med. Sci.* 1964. V. 11. P. 109–125.
- Ishii S.* The ultrastructure of the insunk epithelium lining the planarian pharyngeal cavity // *J. Ultrastruct. Res.* 1966. V. 14. P. 345–355.
- Ito H., Saito Y., Watanabe K., Orii H.* Epimorphic regeneration of the distal part of the planarian pharynx // *Devel. Genes Evol.* 2001. V. 211. P. 2–9.
- Jennings J.B.* Digestive physiology of the *Turbellaria* // *Biology Turbellaria* / Eds. Riser N.W., Morse M.P. N.Y.: McCraw-Hill Co., 1974. P. 173–197.
- Jennings J.B.* Patterns of nutritional physiology in free living and symbiotic *Turbellaria* and their implications for the evolution of entoparasitism in phylum Platyhelminthes // *Acta Zool. Fenn.* 1977. V. 154. P. 63–79.
- Johnston R.N., Halton D.W., Anderson P.A.V. et al.* The peptidergic nervous system of the Triclad *Turbellarian*, *Bdelloura candida* (Maricola, Bdellouridae): An immunocytochemical study using an antiserum raised to an endogenous neuropeptide, GYIRFamide // *J. Comp. Neurol.* 1996. V. 376. P. 214–222.
- Joffe B.I., Reuter M.* The nervous system of *Bothriomolus balticus* (Proseriata) – a contribution to the knowledge of the orthogon in the Platyhelminthes // *Zoomorphology.* 1993. V. 113. P. 113–127.
- Kido T.* Consideration based on the experiments of the regeneration in planaria, with special reference to the formation of the pharynx // *Jap. J. Exp. Morphol.* 1958. V. 12. P. 66–86.
- Kido T.* Studies on the pharynx regeneration in planarian, *Dugesia gonocephala*. 1. Histological observation in the transected pieces // *Sci. Rep. Kanazawa Univ.* 1961. V. 7. № 2. P. 107–124.
- Kishida I.* Histological observation on induction of pharynx by repeated incisions of nerve cords in freshwater planarian, *Dugesia japonica japonica* // *Zool. Sci.* 1986. V. 3. P. 487–495.
- Kishida I., Asai E.* Regeneration of the distal part of the pharynx of the freshwater planarian *Dugesia japonica japonica* // *Ann. Zool. Jap.* 1980. V. 53. P. 89–102.
- Kishida I., Asai E.* Influence of nerve cord removal on pharynx induction by head piece transplanted in postpharyngeal body region of the planarian, *Dugesia japonica japonica* // *Zool. Sci.* 1984. V. 1. P. 737–742.
- Kishida I., Nacagiri K.* Effect of the nerve cord on the pharynx formation in freshwater planarian // *Bull. Sch. Educ. Okayama Univ.* 1982. V. 60. P. 19–31.
- Kobayashi C., Kobayashi S., Orii H. et al.* Identification of two distinct muscles in the planarian *Dugesia japonica* by their expression of myosin heavy chain genes // *Zool. Sci.* 1998. V. 15. P. 861–869.
- Kobayashi C., Watanabe K., Agata K.* The process of pharynx regeneration in planarian // *Devel. Biol.* 1999. V. 211. P. 27–38.
- Koinuma S., Umesono Y., Watanabe K., Agata K.* Planaria FoxA (HNF3) homologue is specifically expressed in the pharynx-forming cells // *Gene.* 2000. V. 259. P. 171–176.
- Kreshchenko N.D.* Functions of flatworm neuropeptides NPF, GYIRF and FMRF in course of pharyngeal regeneration of anterior body fragments of planarian, *Girardia tigrina* // *Acta Biol. Hungarica.* 2008. V. 59 (Suppl). P. 199–207.
- Kreshchenko N.D., Reuter M., Sheiman I.M. et al.* Relationship between musculature and nervous system in the regenerating pharynx in *Girardia tigrina* (Platyhelminthes) // *Invert. Reprod. Devel.* 1999. V. 35. P. 109–125.
- Kreshchenko N., Sheiman I., Reuter M. et al.* Effects of FMRFamide-related peptides and Neuropeptide F on planarian regeneration (Platyhelminthes, Tricladida) // *Belg. J. Zool.* 2001. V. 131S. P. 147–148.
- Lender T.H.* Factors in morphogenesis of regenerating freshwater Planaria // *Advances in morphogenesis.* V. 2. N.Y.: Columbia Univ., 1962. P. 305–331.
- Liotti F.S., Bruscellini G.* Rapporti tra gangli cefalici e regenerazione del faringe in *Dugesia lugubris* // *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.* 1966. V. 42. №. 20. P. 1407–1411.
- MacRae E.K.* Observation on the fine structure of pharyngeal muscle in the planarian *Dugesia tigrina* // *J. Cell. Biol.* 1963. V. 18. P. 651–662.
- Mäntylä K., Halton D.W., Reuter M. et al.* The nervous system of *Tricladida*. IV. Neuroanatomy of *Planaria torva* (Plaudicola, Planariidae): an immunocytochemical study // *Hydrobiologia.* 1998. V. 383. P. 167–173.
- Maule A.G., Shaw C., Halton D.W. et al.* Neuropeptide F: a novel parasitic flatworm regulatory peptide from *Moniezia expansa* (Cestoda: Cyclophyllidae) // *Parasitology.* 1991. V. 102. P. 309–316.
- Morgan T.H.* Regeneration. L.: MacMillian Co., 1901. 293 p.
- Okada Y.K., Kido T.* Further experiments on transplantation in planaria // *J. Fac. Sci. Tokyo Univ.* 1943. V. 4. №. 6. P. 1–23.
- Okada Y.K., Sugino H.* Transplantation experiments in *Planaria gonocephala*. I // *Proc. Imp. Acad. Jpn.* 1934a. V. 10. P. 37–40.
- Okada Y.K., Sugino H.* Transplantation experiments in *Planaria gonocephala*. II // *Ibid.* 1934b. V. 10. P. 107–110.
- Okada Y.K., Sugino H.* Transplantation experiments in *Planaria gonocephala* (Duges) // *Jap. J. Zool.* 1937. V. 7. P. 373–439.
- Onodera K., Kobayashi S., Ishida S.* Pharynx formation in regeneration of the freshwater planarian *Phagocata vivida* // *Zool. Sci.* 1992. V. 9. P. 1185.
- Orii H., Ito H., Watanabe K.* Anatomy of the planarian *Dugesia japonica*. I. The muscular system revealed by antiserum against myosin heavy chain // *Ibid.* 2002. V. 19. P. 1123–1131.

- Pascolini R.* Recerche sulla rigenerazione del faringe in planaria // *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.* 1966. V. 42. P. 968–969.
- Pascolini R.* Recerche sulla rigenerazione del faringe in esemplari bifaringei di *Dugesia lugubris* // *Riv. Biol.* 1970. V. 63. №. 3–4. P. 483–497.
- Pascolini R., Facchini L., Farnesi R.M.* Alcune osservazioni ultrastrutturali sulle fibre nervose del faringe in *Dugesia lugubris* // *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1971. V. 47. P. 380–383.
- Reddien P.W., Bermenge A.L., Murfitt K.J. et al.* Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria // *Devel. Cell.* 2005. V. 8. P. 635–649.
- Reuter M., Eriksson K.* Catecholamines demonstrated by glyoxylic-acid-induced fluorescence and HPLC in some microturbellarians // *Hydrobiologia.* 1991. V. 229. P. 209–220.
- Reuter M., Kreshchenko N.* Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration // *Can. J. of Zool.* 2004. V. 82. P. 334–356.
- Reuter M., Gustafsson M.K.S., Shahlgren C. et al.* The nervous system of *Tricladida*. I. Neuroanatomy of *Procerodes litoralis* (Maricola, Procerodidae): an immunocytochemical study // *Invert. Neurosci.* 1995a. V. 1. P. 113–122.
- Reuter M., Gustafsson M.K.S., Sheiman I.M. et al.* The nervous system of *Tricladida*. II. Neuroanatomy of *Dugesia tigrina* (Paludicola, Dugesidae): immunocytochemical study // *Ibid.* 1995b. V. 1. P. 133–143.
- Reuter M., Maule A.G., Halton D.W. et al.* The organization of the nervous system in Plathelminthes. The neuropeptide F-immunoreactive pattern in Catenulida, Macrostomida, Proseriata // *Zoomorphology.* 1995c. V. 115. P. 83–97.
- Reuter M., Sheiman I., Gustafsson M.K.S. et al.* C. Development of the nervous system in *Dugesia tigrina* during regeneration after fissioning and decapitation // *J. Invert. Repr.* 1996. V. 29. P. 199–211.
- Sakai T., Kato K., Watanabe K., Orii H.* Planarian pharynx regeneration revealed by the expression of myosin heavy chain-A // *Int. J. Devel. Biol.* 2002. V. 46. P. 329–332.
- Saló E.* The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes) // *BioEssays.* 2006. V. 28. P. 546–559.
- Saló E., Baguñà J.* Stimulation of cellular proliferation and differentiation in the intact and regenerating planarian *Dugesia tigrina* by neuropeptide substance P // *J. Exp. Zool.* 1986. V. 237. P. 129–135.
- Saló E., Baguñà J.* Regeneration in planarians and other worms: New findings, new tools, and new perspectives // *Ibid.* 2002. V. 292. P. 528–539.
- Sanchez Alvarado A., Kang H.* Multicellularity, stem cells and neoblasts of the planarian *Schmidtea mediterranean* // *Exp. Cell Res.* 2005. V. 306. P. 299–308.
- Santos F.V.* Studies on transplantation in planaria // *Biol. Bull.* 1929. V. 57. P. 188–197.
- Santos F.V.* Studies on transplantation in *Planaria dorotocephala* and *Planaria maculata* // *Physiol. Zool.* 1931. V. 4. P. 111–164.
- Schilt J.* Induction d'un pharynx supplementaire par des incisions repetees chez la planaire *Dugesia lugubris* O.Schm // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1972. V. 27. №. 1. P. 15–24.
- Sengel Ph.* Sur les conditions de la regeneration normale du pharynx ches la Planarie *Dugesia (=Euplanaria) lugubris* O.Schm // *C. R. Soc. Biol.* 1951. V. 145. P. 1381–1384.
- Sengel Ph.* Sur l'induction d'une zone pharyngienne chez la planaire d'eau douce *Dugesia lugubris* // *Arch. Anat. Micr. Morphol. Exp.* 1953. V. 42. № 1. P. 57–66.
- Shibata N., Umesono Y., Orii H. et al.* Expression of vasa(vas)- related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians // *Devel. Biol.* 1999. V. 206. P. 73–87.
- Shirasawa Y., Makio N.* Pharyngeal regeneration in the land planarian *Bipalium kewense* // *Hydrobiologia.* 1991. V. 227. P. 57.
- Steinmann P.* Untersuchungen uber das Verhalten des Verdauungssystems bei der Regeneration der Tricladen // *Arch. Entw. Organ.* 1908. V. 25. P. 523–568.
- Stevens N.M.* A histological study of regeneration in *Planaria simplissima*, *P. maculata* and *P. morgani* // *Roux' Arch.* 1907. V. 24. P. 350–357.
- Sugino H.* Miscellany on planarian transplantation, a supplemental note to the transplantation experimental in *Planaria gonocephala* // *Ann. Zool. Jap.* 1938. V. 17. P. 185–187.
- Tacher H.F.* The regeneration of the pharynx in *Planaria maculata* // *Amer. Naturalist.* 1902. V. 36. P. 633–641.
- Van Asperen K.* Pharynx regeneration in postpharyngeal fragments of *Planaria simplissima* // *Proc. Acad. Sci. Amst.* 1946. V. 49. P. 1083–1090.
- Welsh J.H., King E.C.* Catecholamines in planarian // *Comp. Biochem. Physiol.* 1970. V. 36. P. 683–688.
- Welsh J.H., Williams L.D.* Monoamine containing neurons in planaria // *J. Comp. Neurol.* 1970. V. 138. P. 103–106.
- Wikgren M.C., Reuter M., Gustafsson M.* Neuropeptides in free-living and parasitic flatworms (Platyhelminthes). An immunocytochemical study // *Hydrobiologia.* 1986. V. 132. P. 93–99.
- Wikgren M.C., Reuter M., Gustafsson M., Lindroos P.* Immunocytochemical localization of histamine in flatworms // *Cell Tiss. Res.* 1990. V. 260. P. 479–484.
- Wolff E.* Recent researches on the regeneration of planaria // *Regeneration.* N.Y.: Ronald Press, 1962. P. 53–84.
- Wolff E., Sengel Ph., Ziller-Sengel C.* Le role de facteur autoinhibiteur dans la regeneration des Planaires (Une interpretation nouvelle de la theorie des gradient physiologique de Chaild) // *Rev. Suisse. Zool.* 1964. V. 71. № 1. P. 75–98.
- Ziller-Sengel C.* Inhibition de la regeneration du pharynx ches les planaires // *Regeneration in animals and related problems.* Amsterdam: North-Holl. Publ. Co., 1965. P. 193–201.
- Ziller-Sengel C.* Recherches sur l'ingibition de la regeneration du pharynx chez les planaires. 1. Mise en evidence d'un facteur auto-inhibiteur de la regeneration du pharynx // *J. Embriol. Exp. Morphol.* 1967a. V. 18. № 1. P. 91–105.
- Ziller-Sengel C.* Sur le facteur inhibiteur de la regeneration du pharynx chez des Planaires d'eau douce // *Bull. Soc. Zool. Fr.* 1967b. V. 92. P. 295–302.
- Ziller C.* La regeneration du pharynx ches la planaire *Dugesia tigrina* // *C.R. Acad. Sci. Paris. D.* 1973. V. 277. P. 1365–1368.

Pharynx Regeneration in Planarians

N. D. Kreshchenko

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Abstract—The obtained and published data on pharynx regeneration in planarians have been reviewed. Planarians can regenerate from a small body fragment and restore all missing organs including the pharynx. The pharynx is a relatively autonomous organ with a differentiated structure and specialized function. Pharynx regeneration has specific features, and its studies are of considerable theoretical interest. Pharynx regeneration can also be a convenient model to study the molecular mechanisms of regeneration that remain undisclosed. In addition, this model can be used to test biologically active compounds in order to elucidate their effect on morphogenesis. This subject of investigation benefits by a simpler and more adequate analysis as well as a possibility to use large numbers of animals and small quantities of analyzed substances.

Key words: planarians, regeneration, pharynx, nervous system, neuropeptides.