

УДК 591.746:591.3:611-013

## РЕТИНОВАЯ КИСЛОТА КАК РЕГУЛЯТОР МОРФОГЕНЕЗА ПЛАНАРИЙ<sup>1</sup>

© 2009 г. О. Н. Ермакова, А. М. Ермаков, Х. П. Тирас, В. В. Леднев

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН  
142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, д.3

E-mail: ao\_ermakovy@rambler.ru

Поступила в редакцию 25.03.09 г.  
Окончательный вариант получен 08.06.09 г.

Исследовано влияние ретиноевой кислоты на регенерацию двух видов бесполок рас планарий *Girardia tigrina* и *Schmidtea mediterranea*. Установлено, что ретиноевые кислоты в физиологических концентрациях ( $10^{-7}$ – $10^{-10}$  М) ингибируют регенерацию головной части планарий, но не оказывают воздействия на рост хвостовой бластемы. Показано, что ингибирование регенерации головной части происходит в результате ареста клеточного цикла пролиферирующих стволовых клеток – необластов – при переходе от фазы  $G_1/G_0$  к фазе S. Таким образом, для примитивных двухсторонне-симметричных животных – планарий – продемонстрирована морфогенетическая роль ретиноевых кислот.

*Ключевые слова:* планарии, ретиноевая кислота, регенерация, стволовые клетки.

Ретиноиды и ретиноевые кислоты, в частности, известны как активные морфогены, регулирующие у позвоночных животных процессы развития и роста (Мэйден, 1995). В развивающемся организме создаются морфогенетические градиенты распределения этих веществ в концентрациях порядка 100 нМ, обеспечивающие контроль процессов морфогенеза (Scadding, Maden, 1994; Sharon et al., 2000). Взаимодействуя с ядерными рецепторами RAR (retinoic acid receptor) и RXR (retinoid X receptor), ретиноевые кислоты напрямую регулируют экспрессию многих генов, контролирующих восприятие позиционной информации, клеточный цикл и т. д. (Mark et al., 2006).

У первичноротых животных (Protostomia) возможность регуляции морфогенеза ретиноевой кислотой была показана для моллюсков (на стадии трохофоры) (Creton et al., 1993) и губок (Wiens et al., 2003). Во многих группах беспозвоночных были обнаружены гомологи рецептора RXR и выявлено присутствие ретиноевой кислоты в тканях, но способность взаимодействовать с рецептором и вызывать морфогенетические эффекты продемонстрирована не была (Jones et al., 2006). На сегодняшний день роль ретиноидов в морфо- и эмбриогенезе у вторичноротых животных (Deuterostomia) можно считать доказанной, тогда как у первичноротых этот вопрос остается до сих пор открытым.

Пресноводные плоские черви планарии, обладая уникальной способностью к регенерации за счет пролиферации и дифференцировки столовых клеток необластов, являются идеальным объектом для изучения процессов морфогенеза (Sanchez Alvarado et al., 2002). Возможность подавления регенерации планарий *Girardia tigrina* с помощью ретиноевой кислоты была впервые продемонстрирована в работе Ромеро и Буэно (Romero, Bueno, 2001). Было показано, что инкубация в течение 10 сут регенерирующих планарий в этанольном растворе all-транс-ретиноевой кислоты в концентрации  $5 \times 10^{-4}$  М приводит к подавлению регенерации головного конца тела у 30% животных и к последующей гибели планарий. Интересно, что это вещество не влияет на регенерацию хвостовой части. Двухчасовая инкубация регенерантов в растворе ретиноевой кислоты ( $5 \times 10^{-4}$  М) сразу после ампутации головного конца тела приводила к замедлению процесса регенерации. Авторы работы в силу неоднозначного, возможно токсического, эффекта подвергли сомнению морфогенетическую роль ретиноевой кислоты у планарий. Мы предполагаем, что в выбранных авторами условиях приготовления растворов ретиноида могли проявиться токсические эффекты не только ретиноевой кислоты, но и этанола, используемого в качестве стокового растворителя.

Цель нашей работы – исследование влияния физиологических концентраций ретиноевых кислот и выяснение морфогенетической роли этих веществ в

<sup>1</sup> Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (государственный контракт № 02.740.11.0312).

процессах пролиферации необластов и регенерации планарий.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследование выполнено на бесполом расе двух видов пресноводных плоских червей – планарий *Girardia tigrina* и *Schmidtea mediterranea* (Platyhelminthes, Tricladida). Для экспериментов отбирали планарий длиной около 10 мм и за 7 сут до опытов прекращали их кормление. Регенерацию головы вызывали ампутацией 1/5 части тела, содержащей головной ганглий. Хвостовую часть тела ампутировали на расстоянии 1–2 мм от конца тела животного. Каждая контрольная и опытная группа содержали по 30 особей.

В работе использовали *all-транс*-ретиноевую кислоту, *9-цис*-ретиноевую кислоту, а также синтетический ретиноид, являющийся специфическим агонистом для рецепторов RAR ретиноевой кислоты, – а ретиноидную кислоту (все препараты “Sigma”, США). Стоковые растворы веществ в концентрации  $10^{-2}$  М готовили путем растворения в диметилсульфоксиде (ДМСО). Конечные концентрации ретиноидов составляли от  $10^{-10}$  до  $10^{-7}$  М. Вода контрольных групп планарий содержала ДМСО, равный его концентрации в воде опытных групп. Конечные концентрации ДМСО  $\leq 10^{-6}$  М для планарий во всех группах были нетоксичными и не оказывали влияния на регенерацию как головного, так и хвостового отделов животного.

Температуру воды, равную 21°C в экспериментальном и контрольном стаканах, поддерживали с одинаковой точностью  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ . Эксперименты каждой серии повторяли не менее трех раз. Статистическую обработку и анализ результатов проводили с помощью программы Sigma-Plot 9.0 (“Systat Software Inc.”, США).

Кинетику роста бластемы в экспериментальных и контрольных группах животных определяли методом прижизненной компьютерной морфометрии, который основан на регистрации фотоконтраста между старыми (пигментированными) и новыми (прозрачными) частями тела планарий (Тирас и др., 1996). Изображения регенерирующих планарий регистрировали с помощью смонтированной на биноклярной лупе видеокамеры Argo 7500 через 72 ч после ампутации. На полученных изображениях планарий определяли площадь ( $S$ ) всей планарии и площадь ( $s$ ) прозрачной регенерирующей бластемы. Процесс регенерации планарий характеризовали индексом регенерации  $R$ , который определяли по формуле  $R = s/S$ . Величину биоэффекта (воздействия на процесс регенерации) оценивали как относительную разницу  $\Delta R$  между средними значениями

индекса регенерации для контрольных и опытных групп, выраженную в %. Каждое из определяемых значений  $R$  являлось результатом усреднения измерений 30 животных как в опыте, так и контроле. Ошибка в определении  $R$  не превышала 3%.

Изменения уровня пролиферации стволовых клеток планарий оценивали с помощью определения митотической активности необластов в постбластеме (ткани, непосредственно примыкающей к бластеме) после остановки пролиферации клеток в фазе  $M$  клеточного цикла колхицином. Сразу после ампутации у планарий головной или хвостовой частей в среду с животными добавляли колхицин в концентрации 0.05%. Стоковый 1%-ный раствор колхицина (“Sigma”, США) готовили путем растворения навески вещества в дистиллированной воде. Через 24 ч участки постбластемы ампутировали и помещали для диссоциации в раствор, содержащий смесь ледяной уксусной кислоты, 96%-ного этилового спирта, глицерина и воды в соотношении объемов 1 : 3 : 2 : 14. Для выявления метафазных фигур использовали флуоресцентный краситель Hoechst-33342 (“Sigma”, США) в концентрации 1 мкг/мл. Стоковый раствор Hoechst-33342 в концентрации 100 мкг/мл готовили путем растворения навески вещества в дистиллированной воде. На полученных препаратах клеток с помощью микроскопа ЛЮМАМ-2 (“ЛОМО”, Россия) определяли число метафазных фигур на 1000 клеток (митотический индекс,  $MI$ ). Величину биоэффекта оценивали как относительную разницу  $\Delta MI$  между средними значениями  $MI$  для контрольных и опытных групп, выраженную в %. Каждое экспериментально полученное значение  $MI$  является результатом усреднения по 30000 клеток.

Для исследования влияния ретиноидов на фазы клеточного цикла необластов применяли метод точной цитофлуориметрии. Для этого из ткани, взятой из области постбластемы регенерантов 1-х сут, готовили суспензию клеток. Кусочки тела животных (0.5 мм) помещали в 300 мкл 0.1 М раствора лимонной кислоты (“Sigma”, США), содержащего 0.5%-ный Твин 20 (“Sigma”, США), на 10 мин при комнатной температуре. Далее ткань суспендировали кратковременным встряхиванием на вортексе (“Elmi”, Латвия) в течение 10 с. К полученной суспензии клеток добавляли 1 мл 0.4 М раствора  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , содержащего 10 мкг/мл флуоресцентного красителя ДНК Hoechst-33342, и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Непосредственно перед анализом клеточную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр Filcons (“Becton Dickinson”, Германия) с диаметром пор 50 мкм. Отсутствие клеточных агрегатов в полученных суспензиях

зиях проверяли с помощью флуоресцентного микроскопа ЛЮМАМ-2.

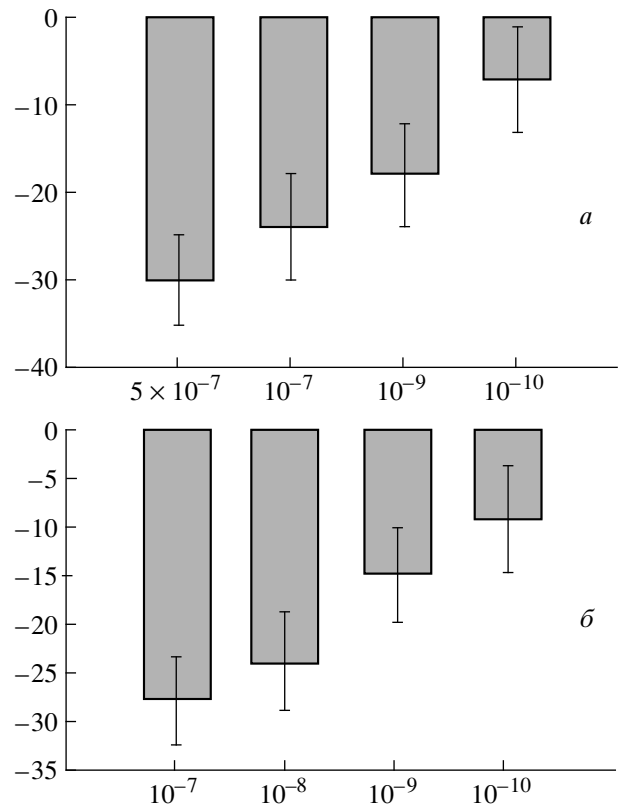
Клеточные суспензии анализировали на проточном цитофлуориметре Partec PAS III ("Partec", Германия) со скоростью 100–200 клеток в с. Цитограммы строили путем определения в 50000 клетках относительного содержания ДНК в клеточных ядрах (детектор FL 4). На полученных цитограммах с помощью программы FloMax ("Partec") оценивали долю клеток, находящихся в фазах клеточного цикла  $G_0/G_1$ ,  $S$  и  $G_2/M$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ

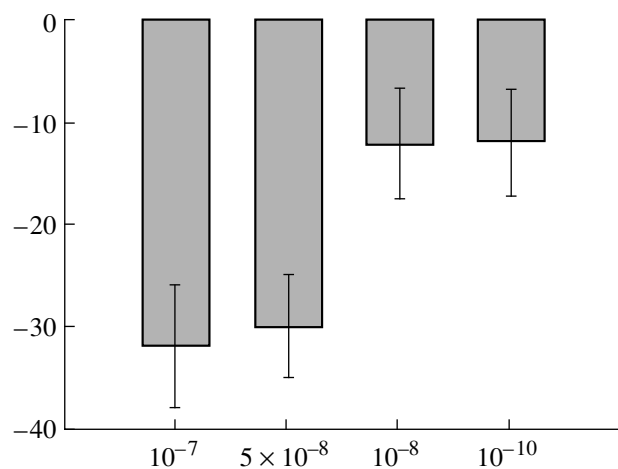
Инкубация регенерирующих планарий в растворах all-транс- и 9-цис-ретиновых кислот приводила к достоверному подавлению роста головной бластемы у планарий *G. tigrina* и *S. mediterranea*, но не влияла на регенерацию хвостовой части тела. Эффект воздействия all-транс-ретиновой кислоты на регенерацию планарий *G. tigrina* имел концентрационную зависимость с максимумом  $-35 \pm 6.4\%$  при концентрации вещества, равной  $5 \times 10^{-7}$  М, и минимумом  $-8 \pm 5\%$  – при  $10^{-10}$  М (рис. 1, а). Подобные эффекты наблюдали также в серии разведений 9-цис-ретиновой кислоты. Так, максимальный уровень ингибирования роста бластемы ( $-28 \pm 4.5\%$ ) наблюдали при концентрации  $10^{-7}$  М, а минимальный ( $-9 \pm 5.5\%$ ) – при  $10^{-10}$  М (рис. 1, б).

Ингибирование роста головной бластемы планарий *S. mediterranea* растворами all-транс-ретиновой кислоты также проявляло концентрационную зависимость с максимумом эффекта ( $-31 \pm 5\%$ ) при концентрации вещества  $10^{-7}$  М и минимумом ( $-11 \pm 5.4\%$ ) – при  $10^{-10}$  М (рис. 2). Характерно, что у планарий *G. tigrina* и *S. mediterranea* ингибирование регенерации головы ретиновыми кислотами сопровождалось не только значительным замедлением роста бластемы, но и временной задержкой появления глаз. Так, в контрольных группах глаза у регенератов обоих видов планарий появлялись к концу 2-х сут после начала регенерации, а у опытных групп – только к концу 3-х.

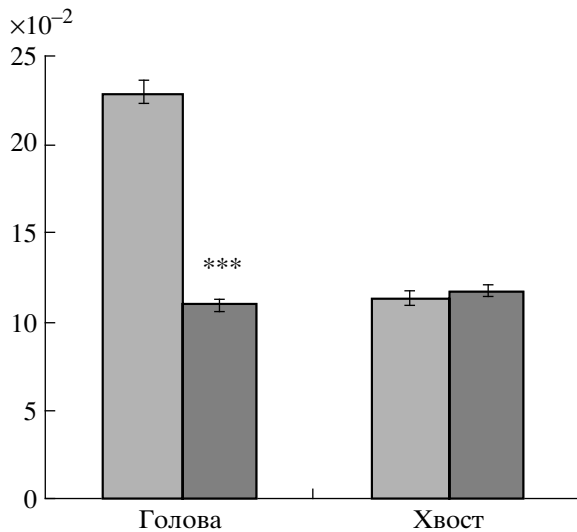
Помещение регенерирующих планарий *G. tigrina* и *S. mediterranea* в раствор аретиноидной кислоты в концентрации  $10^{-6}$  М приводило к гибели животных, тогда как инкубация в растворах вещества с концентрацией  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  и  $10^{-9}$  М гибели планарий не вызывала и не действовала на регенерацию головной части животных. Анализ *MI* в головной постбластеме показал, что в растворе all-транс-ретиновой кислоты с концентрацией  $10^{-7}$  М у опытной группы планарий *G. tigrina* он был меньше контрольной на  $45 \pm 3\%$ . При этом в хвостовой постбластеме дан-



**Рис. 1.** Влияние all-транс-ретиновой (а) и 9-цис-ретиновой кислот (б) на рост головной бластемы планарий *G. tigrina*. Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс – концентрация кислоты, М; по оси ординат – величина эффекта  $\Delta R$ , вычисленная по формуле:  $\Delta R = \frac{(R_{\text{Э}} - R_{\text{К}}) \pm (m_{\text{Э}} + m_{\text{К}})}{R_{\text{К}}} \times 100\%$ , где  $\Delta R$  – разница между средними величинами индекса регенерации в экспериментальных  $R_{\text{Э}}$  и контрольных  $R_{\text{К}}$  образцах, а  $m_{\text{Э}}$ ,  $m_{\text{К}}$  – ошибки среднего для измерений в опыте и контроле; все отличия достоверны при  $p < 0.001$ .



**Рис. 2.** Влияние all-транс-ретиновой кислоты на рост головной бластемы планарий *S. mediterranea*.



**Рис. 3.** Воздействие all-*транс*-ретиноевой кислоты на пролиферацию неопластов головной и хвостовой постбластемы планарий *G. tigrina*. По оси ординат – митотический индекс *MI*. Животные: (□) – контрольные, (■) – опытные.

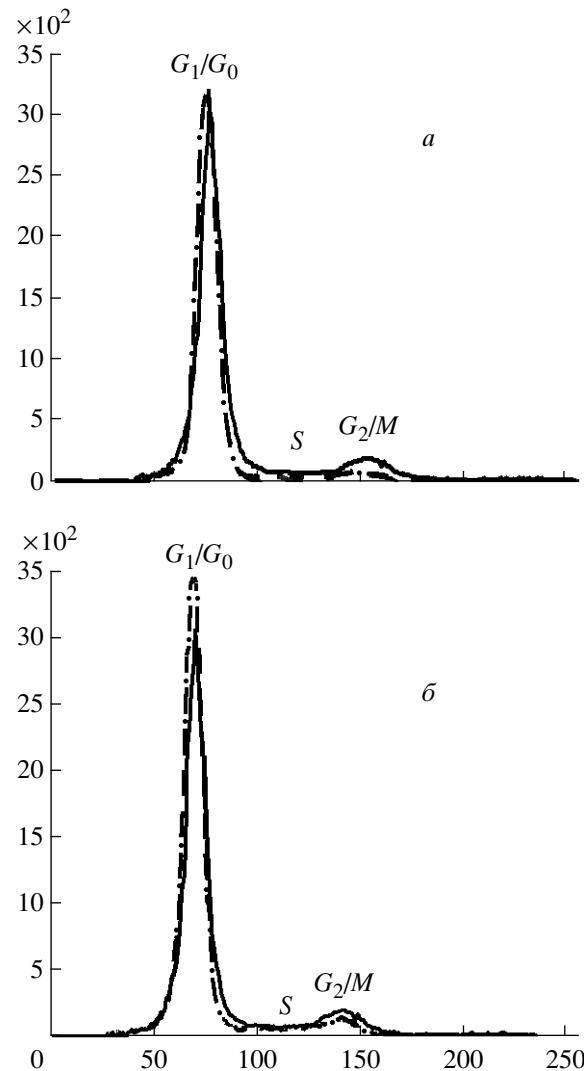
\*\*\* Отличия достоверны при  $p < 0.001$ .

ный параметр не отличался от контрольных значений (рис. 3).

Проточная цитофлуориметрия клеточных суспензий, полученных из ткани головной постбластемы регенерирующих планарий *S. mediterranea* после инкубации в растворах ретиноевых кислот в концентрации  $10^{-7}$  М, выявила следующие закономерности: 9-*цис*-ретиноевая кислота вызывала достоверное снижение количества пролиферирующих клеток, находящихся в фазах *S* и  $G_2/M$  клеточного цикла на 47 и 66% соответственно (рис. 4, *a*; таблица). All-*транс*-ретиноевая кислота также обладала ингибирующим действием на клеточный цикл. В этом случае доля клеток находящихся в фазах *S* и  $G_2/M$  клеточного цикла достоверно уменьшалась на 12 и 54% соответственно (рис. 4, *б*; таблица). Характерно, что действие ретиноевых кислот не приводило к изменению клеточного цикла неопластов в хвостовой постбластеме животных. Проточная цитофлуориметрия клеточных суспензий, полученных из ткани головной постбластемы регенерирующих планарий *G. tigrina*, дополнительно выявила наличие диплоидной и триплоидной популяций клеток (рис. 5). По этой причине количественный анализ по фазам клеточного цикла в такой смешанной клеточной популяции данной расы планарий оказался невозможен.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Наше исследование показало способность ретиноевых кислот даже в очень низких концентрациях



**Рис. 4.** Сравнение цитометрических профилей клеточных суспензий, полученных из регенерирующих планарий *S. mediterranea* и из регенерантов после суточной инкубации в растворах 9-*цис*-ретиноевой (*a*) и all-*транс*-ретиноевой кислот (*б*). По оси абсцисс – относительное содержание ДНК в ядрах; по оси ординат – число клеток. (—) – контроль, (---) – опыт;  $G_1/G_0$  – соматические клетки и неопласты, находящиеся в фазе клеточного цикла  $G_1/G_0$ ; *S* – неопласты, находящиеся в фазе *S*;  $G_2/M$  – то же в фазе  $G_2/M$ .

специфически ингибировать регенерацию головного отдела планарий. При сопоставлении результатов регенерации головной и хвостовой частей тела планарий были выявлены проксимодистальные отличия в воздействии ретиноевых кислот. Изменения *MI* в головной постбластеме указывают на то, что действие ретиноидов опосредовано ингибированием пролиферации стволовых клеток. Подобная картина наблюдается и при действии ретиноидов на активно пролиферирующие раковые и стволовые клетки млекопитающих (Zhu et al., 1997). В этом случае по-

Влияние ретиновых кислот на клеточный цикл необластов в головной постбластеме планарий *S. mediterranea*

Регенерирующие животные	Доля клеток в фазах, %			Уменьшение доли клеток в фазах, $\Delta\%$ <sup>†</sup>	
	$G_0/G_1$	$S$	$G_2/M$	$S$	$G_2/M$
Контрольные	81.4 ± 0.10	9.65 ± 0.20	8.95 ± 0.28	–	–
Инкубация с 9- <i>цис</i> -ретиновой кислотой	91.77 ± 0.09	5.16 ± 0.11	3.08 ± 0.40	47 ± 3.2**	66 ± 7.6**
Инкубация с all- <i>транс</i> -ретиновой кислотой	87.34 ± 0.10	8.52 ± 0.15	4.14 ± 0.32	12 ± 3.6*	56 ± 6.7**

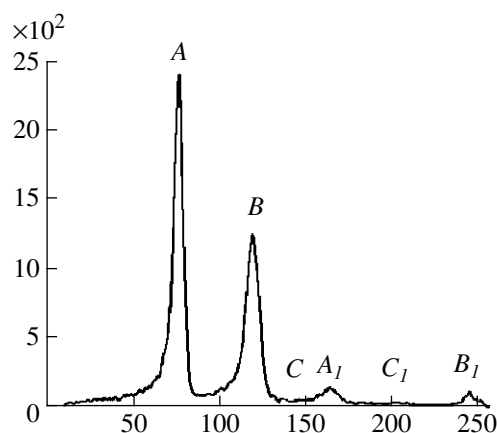
Примечание: различия достоверны: \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.001$  ( $t_{st}$ ,  $n = 6$ ).

<sup>†</sup> Вычислялось по формуле:  $\Delta\% = \frac{(\mathcal{E} - K) \pm (m_{\mathcal{E}} - m_K)}{K} \times 100\%$ , где  $K$  и  $\mathcal{E}$  – контрольное и экспериментальное количество клеток в фазах  $S$  или  $G_2/M$  клеточного цикла;  $m_K$  и  $m_{\mathcal{E}}$  – стандартные ошибки этих значений.

казано, что ретиновые кислоты, взаимодействуя со специфическими ядерными рецепторами, приводят к ингибированию экспрессии генов циклинов, циклинзависимых протеинкиназ, а также генов, контролирующих апоптоз. Это в свою очередь приводит к подавлению пролиферации клеток на определенной фазе клеточного цикла и в некоторых случаях к апоптозу (Roninson, Dokmanovic, 2003). У высших животных ретиновые кислоты также способны к индукции дифференцировки пролиферирующих лейкозных клеток (Breitman et al., 1980). У планарий под воздействием ретиновых кислот обнаруживается

временная задержка появления глаз, которые являются морфологическим маркером дифференцировки клеток переднего отдела тела. По-видимому, в этом случае воздействие ретиновых кислот ведет к торможению роста клеточной популяции малодифференцированных клеток и замедлению морфогенеза при регенерации.

У планарий *S. mediterranea* под воздействием ретиновых кислот мы наблюдали специфическое ингибирование пролиферации необластов при переходе от фазы  $G_1/G_0$  к  $S$  клеточного цикла, что приводило к падению числа клеток, находящихся в фазах  $S$  и



**Рис. 5.** Цитометрический профиль клеточной суспензии, полученной из регенерирующих планарий *G. tigrina*. По оси абсцисс – относительное содержание ДНК в клетках; по оси ординат – число клеток. Клетки:  $A$  – диплоидные (фаза  $G_1/G_0$ ),  $B$  – триплоидные ( $G_1/G_0$ ),  $A_1$  – тетраплоидные ( $G_2/M$ ),  $B_1$  – гексаплоидные ( $G_2/M$ );  $C$ ,  $C_1$  – в фазе  $S$  клеточного цикла.

$G_2/M$ . Возможно также, что подобный эффект вызывало не только ингибирование клеточного цикла необластов, но и индукция гибели этих клеток путем апоптоза.

Воздействие ретиноидов на физиологические процессы у планарий, так же как у высших животных, очевидно, осуществляется при связывании с ядерными рецепторами ретиновых кислот RAR или RXR. Наше исследование показало, что воздействие ароматической кислоты – специфического агониста для рецепторов RAR ретиновых кислот – не приводило к ингибированию регенерации головного отдела, что предполагает наличие в клетках планарий рецептора другого типа – RXR. На это указывает и тот факт, что 9-*цис*-ретиновая кислота, являясь прямым лигандом рецептора RXR (Germain et al., 2006), сильнее подавляет пролиферацию необластов, чем *all-транс*-ретиновая кислота. Следует отметить, что у паразитического плоского червя *Schistosoma mansoni*, как и у всех первичноротых животных, обнаружен пока только рецептор RXR (Freebern et al., 1999).

По нашим данным, ретиновые кислоты в достаточно высоких концентрациях не вызывают ингибирования клеточного цикла и пролиферации необластов в хвостовой постбластеме планарий. Подобные эффекты указывают на морфогенетическую роль ретиновых кислот и объясняются, вероятно, так же, как и у высших животных, существованием дистопроксимальных градиентов экспрессии белков, принимающих участие в депонировании и метаболизме ретиновых кислот (Duester, 2008). Такими белками, в частности, являются алкогольдегидрогеназы классов 1, 3 и 4 (Moss et al., 1998). Интересно, что у планарии *S. mediterranea* обнаружена экспрессия фермента алкогольдегидрогеназы 3-го класса с максимумом в головной и минимумом в хвостовой частях (Godoy et al., 2007).

Интересно, что подобный дистопроксимальный градиент воздействия на регенерацию планарий отмечен не только для ретиноидов. Гормон мелатонин, взаимодействуя, очевидно, с мембранными рецепторами, вызывает ингибирование регенерации головы, но не хвоста у планарий, специфически подавляя пролиферацию необластов в головной постбластеме (Ермакова и др., 2009). Мы предположили, что это связано с распределением рецепторов мелатонина в теле планарий. Сходные по характеру данные были получены при исследовании дистопроксимальной зависимости действия пептидного морфогена гидры (головного активатора) на регенерацию у планарий *G. tigrina* (Тирас и др., 1989). Головной активатор регенерации гидры в концентрации  $10^{-7}$  М стимулировал регенерацию головного конца тела планарий и не влиял на регенерацию хвостового отдела. Поскольку во всех трех случаях участвуют различные рецепторы, можно предположить, что регу-

ляция установления дистопроксимальных взаимоотношений в морфогенезе имеет общие точки триггеры для разных сигнальных систем.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что ретиновые кислоты у плоских червей планарий являются активными специфическими морфогенами – ингибиторами регенерации головного конца тела животного. По-видимому, в основе их функционирования лежат сходные с имеющимися у вторичноротых животных механизмы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ермакова О.Н., Ермаков А.М., Тирас Х.П., Леднев В.В. Влияние мелатонина на регенерацию планарий *Girardia tigrina* // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 6. С. 466–469.
- Мэйден М. Участие ретиновой кислоты в эмбриональном и постэмбриональном развитии // Там же. 1995. Т. 26. № 6. С. 419–429.
- Тирас Х.П., Рубина А.Ю., Милосердов Ю.В., Тищенко В.А. Морфоген гидры – возможный эндогенный регулятор регенерации планарий // Морфогенетически активные вещества / Под ред. Шейман И.М. Пушино: Изд-во АН СССР, 1989. С. 134–145.
- Тирас Х.П., Сребницкая Л.К., Ильасова Е.Н. и др. Влияние слабого комбинированного магнитного поля на скорость регенерации планарий *Dugesia tigrina* // Биофизика. 1996. Т. 40. № 4. С. 826–831.
- Breitman T.R., Selonick S.E., Collins S. J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid // Proc. Natl. Acad. Sci. 1980. V. 77. P. 2936–2940.
- Creton R., Zwann G., Gohmen R. Specific developmental defects in molluscs after treatment with retinoic acid during gastrulation // Devel. Growth Differ. 1993. V. 35. P. 357–364.
- Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis // Cell. 2008. V. 134. P. 921–931.
- Freebern W.J., Osman A., Niles E.G. et al. Identification of a cDNA encoding a retinoid X receptor homologue from *Schistosoma mansoni* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 4577–4585.
- Germain P., Chambon P., Eichele G. et al. International union of pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors // Pharmacol. Rev. 2006. V. 58. P. 760–772.
- Godoy L., González-Duarte R., Albalat R. Analysis of planarian Adh3 supports an intron-rich architecture and tissue-specific expression for the urbilaterian ancestral form // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 2007. V. 146. № 4. P. 489–495.
- Jones G., Jones D., Teal P. et al. The retinoid-X receptor ortholog, ultraspiracle, binds with nanomolar affinity to an endogenous morphogenetic ligand // FEBS. 2006. V. 273. P. 1–14.
- Mark M., Ghyselinck N.B., Chambon P. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signalling pathway during mouse embryogenesis // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2006. V. 46. P. 451–480.
- Moss J.B., Xavier-Neto J., Shapiro M.D. et al. Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart // Devel. Biol. 1998. V. 199. P. 55–71.
- Romero R., Bueno D. Disto-proximal regional determination and intercalary regeneration in planarians, revealed by retinoic acid

- induced disruption of regeneration // *Int. J. Devel. Biol.* 2001. V. 45. P. 669–673.
- Roninson I.B., Dokmanovic M. Induction of senescence-associated growth inhibitors in the tumor-suppressive function of retinoids // *J. Cell. Biochem.* 2003. V. 88. P. 83–94.
- Sanchez Alvarado A., Newmark P.A., Robb S.M. et al. The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration // *Development*. 2002. V. 129. P. 5659–5665.
- Scadding S.R., Maden M. Retinoic acid gradients during limb regeneration // *Devel. Biol.* 1994. V. 162. P. 608–617.
- Sharon A.R., McCaffery P.J., Drager U.C. et al. Retinoids in embryonal development // *Physiol. Rev.* 2000. V. 80. P. 1021–1054.
- Wiens M., Batel R., Korzhev M. et al. Retinoid X receptor and retinoic acid response in the marine sponge *Suberites domuncula* // *J. Exp. Biol.* 2003. V. 206. P. 3261–3271.
- Zhu W.Y., Jones C.S., Kiss A. et al. Retinoic acid inhibition of cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells // *Exp. Cell. Res.* 1997. V. 234. P. 293–299.

## Retinoic Acid as a Regulator of Planarian Morphogenesis

O. N. Ermakova, A. M. Ermakov, Kh. P. Tiras, and V. V. Lednev<sup>†</sup>

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*  
e-mail: ao\_ermakovy@rambler.ru

**Abstract**—The effect of retinoic acid on regeneration of two species of asexual planarian races, *Girardia tigrina* and *Schmidtea mediterranea*, was studied. It was established that retinoic acids at physiological concentrations ( $10^{-7}$ – $10^{-10}$  M) inhibit the regeneration of the head part of planarians but have no effect on tail blastema growth. It is shown that regeneration of the head part is inhibited as a result of arrest of the cell cycle of neoblasts, proliferating stem cells, during the transition from the  $G_1/G_0$  to the S phase. Thus, the morphogenetic role of retinoic acids in planarians, primitive bilaterally symmetrical animals, has been demonstrated.

*Key words:* planarians, retinoic acid, regeneration, stem cells.