

УДК 591

РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЛАНАРИЙ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ© 2015 г. **И. М. Шейман**, Н. Д. Крещенко

Институт биофизики клетки РАН

142290, Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 3

E-mail: nkreshch@rambler.ru

Поступила в редакцию 19.12.12 г.

Окончательный вариант получен 27.01.14 г.

Обсуждается целесообразность использования в качестве экспериментальных объектов беспозвоночных животных – плоских червей, планарий. Свободноживущие плоские черви планарии (тип Platyhelminthes, класс Turbellaria) – это беспозвоночные животные, у которых впервые в эволюции появляются билатеральная симметрия, формируются органы и ткани. Как высшее звено экологической пищевой цепи – хищники – эти животные характеризуются набором определенных поведенческих реакций, контролируемых дифференцированной центральной нервной системой. Планарии обладают непревзойденной способностью к регенерации утраченных или поврежденных частей тела. Благодаря простоте их разведения и удобству манипуляций с ними, эти животные используются для исследования влияния химических и физических факторов на процессы жизнедеятельности, развития и размножения. В настоящее время планарии являются признанной биологической моделью для проведения исследований в области регенерации, биологии стволовых клеток, изучения их пролиферации и дифференцировки, а также регуляторных механизмов морфогенетических процессов. Геном планарии *Schmidtea mediterranea* полностью секвенирован, что открывает возможность работы с этим объектом на молекулярно-биологическом уровне. Кроме того, планарии используются в нейробиологических и токсикологических исследованиях, при изучении эволюционных аспектов централизации нервной системы, механизмов мышечного сокращения, при разработке новых антипаразитарных препаратов. Цель данного обзора продемонстрировать широкому кругу читателей актуальность и многообразие исследований, проводимых на простых биологических объектах – планариях, показать историческую преемственность этих исследований, их широкое географическое распространение, а также акцентировать внимание на части исследований, которые проводились и проводятся в России, и, как правило не входят в зарубежные обзоры по регенерации планарий.

Ключевые слова: беспозвоночные, планарии, регенерация, морфогенез, стволовые клетки.

DOI: 10.7868/S0475145015010073

В структуру научной публикации традиционно входит описание методики, включающей представление объекта, если речь идет об экспериментальной биологической работе. При отступлении от привычных и наиболее распространенных объектов требуется подробное описание характеристики нового объекта и обоснование его выбора. Природа наделила некоторых животных такими видовыми особенностями, что создается впечатление, будто она позаботилась об их использовании при изучении определенных биологических явлений. Благодаря таким специфическим свойствам некоторых представителей живого и был осуществлен ряд прорывов в биологии. Среди беспозвоночных животных можно перечислить настоящие модельные объекты, приведшие к научным открытиям. Достаточно назвать пресловутую мушку дрозофилу с ее политенными хромо-

сомами и ее значение для генетики; гигантские нейроны моллюсков и рецепторы растяжения рака – для нейрофизиологии, муравьев и пчел – для этологии. Цель данной публикации – привлечь внимание к объекту, на котором имеется довольно многочисленный опыт исследований.

Одним из важнейших разделов биологии развития является регенерация. В изучении принципов, источников и механизмов процесса регенерации трудно конкурировать по объему исследований и по вкладу с таким объектом, как плоский червь – планария (рис. 1а, 1б, рис. 2). Планарии наделены природой целым рядом замечательных свойств, привлекающих для многих экспериментальных задач. Далее приводится краткая характеристика объекта.

Планарии – низшие черви. Они широко распространены в природе, в пресных и соленых во-

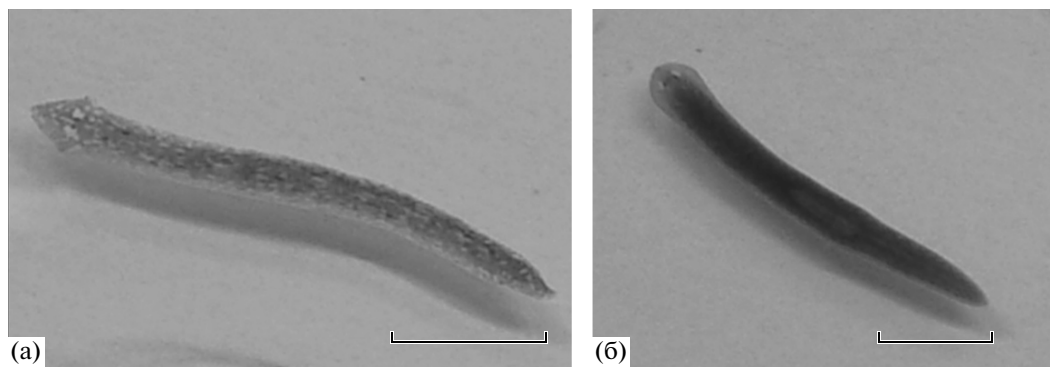


Рис. 1. Пресноводные планарии. (а) – *Girardia tigrina*, (б) – *Schmidtea mediterranea*. Масштаб 1 мм.

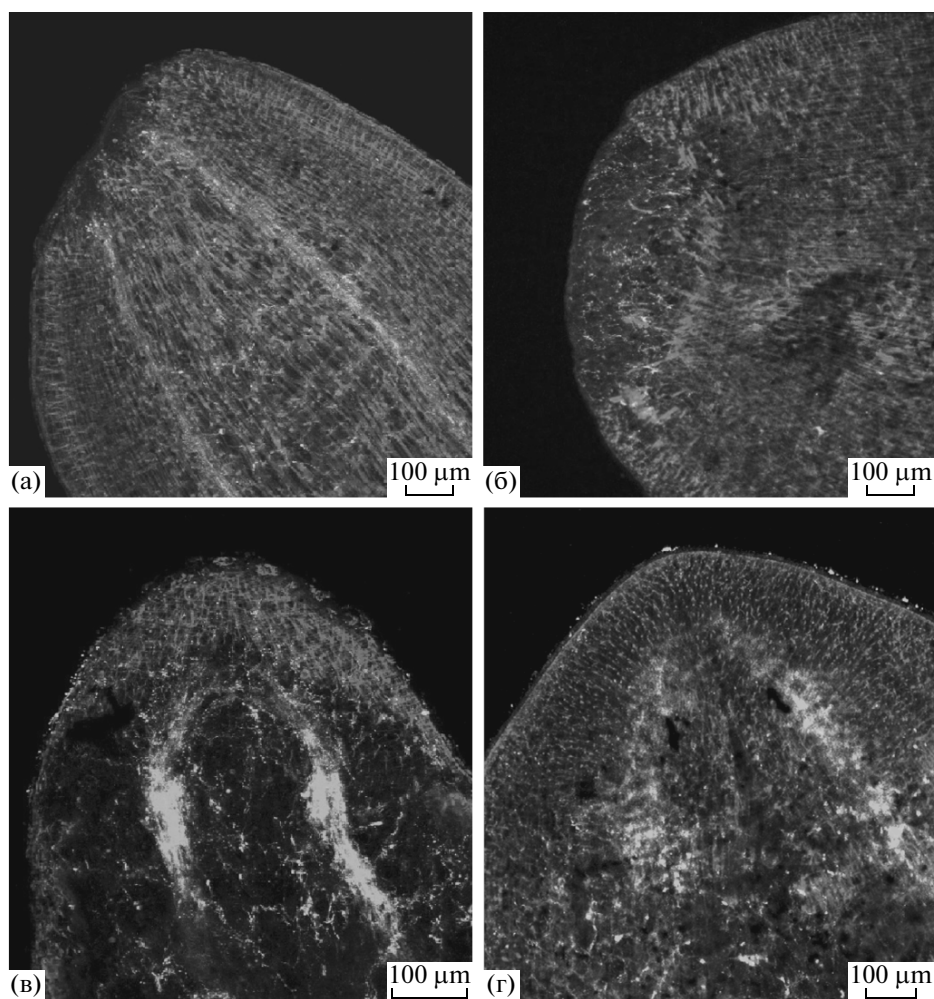


Рис. 2. Регенерация головного конца тела планарий *G. tigrina*. Иммунопозитивная окраска к нейропептиду NPF (светло-серая окраска) в регенерирующем головном нервном ганглии планарий, темно-серая окраска демонстрирует мускулатура тела; (а) – 1 сут, (б) – 2 сут, (в) – 4 сут, (г) – 7 сут регенерации. Масштаб 100 мкм.

дах и на влажных почвах. Чаше встречаются виды, длина тела которых составляет 1–3 см. Пресноводные планарии средних широт располагаются на нижней стороне водных растений или камней, избегая света. Плоское тело планарий бывает

прозрачным, бурым, почти черным, пятнистым и покрыто слизью. Планарии занимают ключевую позицию в эволюции животного мира. У них *впервые* возникает билатеральная симметрия, у них *впервые* происходит концентрация нервных

элементов в центральную нервную систему, у них *впервые* выделяется парный головной ганглий (“мозг”) в передней части тела (рис. 2в, 2г). Ввиду отсутствия у планарий кровеносной системы, большинство клеток связываются друг с другом и средой с помощью сигнальных молекул или химических мессенджеров, которые синтезируются нейронами. В нервной системе планарий обнаружены: серотонин, ацетилхолин, катехоламины, ГАМК, нейропептиды и ростовые факторы (Welsh, Williams, 1970; Тирас и др., 1975; Kabotyanski et al., 1991; Maule et al., 1994; Johnston et al., 1995; 1996; Eriksson, Panula, 1994; Reuter et al., 1995; Nishimura et al., 2007; Cebria et al., 2002, Cebria, 2008; Kreshchenko et al., 2008; Kreshchenko, Tolstenkov, 2012).

Планарии относятся к семейству трехветвистокишечных. Их кишечник состоит из трубки, стенка которой состоит из одного слоя клеток. При принятии пищи стенки клеток естественным образом разрушаются, а по окончании пищеварения клетки естественным образом восстанавливаются, являя собой одну из свойственных планариям моделей физиологической регенерации. Такое поведение кишечника обеспечивает две его функции: пищеварение и распределение питательных веществ (Sheiman, Sakharova, 1974; Sakharova, Sheiman, 1977).

Планарии – гермафродиты и размножаются половым путем. Но есть виды и расы, которые размножаются бесполом путем, простым отделением хвостового фрагмента перетяжкой тела в “зоне деления”. Из двух половинок планарий восстанавливаются два новых полноценных организма. Это еще одна естественная модель регенерации планарий. Из таких фрагментов можно получать популяции чистой линии. Некоторые виды планарий владеют обоими способами размножения (Best et al., 1974, Kobayashi, Hoshi, 2011). Таким образом, планарии обладают способностью не только к репаративной регенерации, вызванной повреждением их тела извне, но и физиологической, обусловленной характером их жизнедеятельности. Постоянное обновление клеток и структур вследствие колоссальной морфогенетической пластичности этих животных обеспечивает циклы пищеварения, бесполого размножения, и ежедневного тканевого самообновления.

Интерес к регенерации планарий имеет свою большую историю. Еще старик Дарвин попробовал взглянуть на замечательное свойство планарий восстанавливаться после рассечения их тела на две части (Darwin, 1884). Методичное изучение этого явления относится к началу 20-го столетия, когда такие классики биологии, как Морган (Morgan, 1901) и Чайлд (Child, 1941) производили эксперименты на планариях и описали основные закономерности их регенерации. Следующий вклад в исследование регенерации планарий при-

надлежит французской школе эмбриологов во главе с Вольфом (Wolff, 1962) и Ланде (Lender, 1965) и относится к середине 20-го века. Они значительно дополнили и углубили понимание этого процесса, определили временные рамки и морфологические характеристики регенерации у планарий. В том же направлении работали в 60-е и последующие годы сотрудники кафедры эмбриологии Ленинградского университета под руководством Б.П. Токина (Токин, 1959). Брондстед собрал и издал наиболее полную для того времени сводку публикаций по регенерации планарий (Bronsted, 1969). В этот период в теле планарий были описаны клетки, названные необластами и обладающие способностью делиться и дифференцироваться в клетки разных тканей. Необласты были идентифицированы гистологически по интенсивной базофилии цитоплазмы и сравнительно слабо развитым цитоплазматическим органеллам, большому ядру и наличию ядрышка, богатого РНК (Pedersen, 1959; Vaguna, 1975a, b; Romero, Vaguna, 1981; Hori, 1992). Многие исследователи, изучающие регенерацию у планарий, придерживались мнения о том, что необласты являются клеточными источниками регенерации (Bronsted, 1969; Wolff, 1962; Lender, 1965).

Всплеск интереса к планариям произошел в 50-е годы и в связи с работами американского зоопсихолога МакКоннелла, которые близко соприкасались с проблемой регенерации (McConnel, 1967). Он исследовал у планарий простейшие условные рефлексы: вырабатывал реакции на световой сигнал, подкрепленный электрическим раздражением. Обученных планарий, реагирующих на свет, как на ток, он разрезал пополам и обнаружил, что регенерировавшие из обеих половинок планарии сохраняли памятный след, образованный у исходной материнской особи. Поскольку этот след сохранялся в равной степени, как у головного, так и у хвостового фрагмента, лишённого церебрального нервного ганглия, МакКоннелл решил, что памятный след сохранялся в особых клетках – необластах, из которых при регенерации образуется новый ганглий. Он приписал эту функцию молекулам РНК, которыми очень богаты необласты. В пору повального интереса к ДНК в середине прошлого столетия возможная связь РНК с хранением и “переносом” памяти прозвучала сенсационно. Во многих лабораториях мира опыты МакКоннелла повторяли и модифицировали, переносили на других животных, а результаты развивали или опровергали. Множественные неудачи в сохранении памятного следа в сходных опытах привели к их постепенному прекращению. Однако, в скромной лаборатории Пушинского биологического Центра в те же годы была предпринята попытка воспроизвести опыты МакКоннелла и найти им объяснение посредством целенаправленного экспе-

риментального анализа. Результаты опытов, полученные МакКоннеллом, действительно подтвердились, но удалось показать, что памятные следы хранятся не в необластах и не в молекулах РНК, а каким-то образом связаны с центральной нервной системой планарий (Шейман, 1984). При рассечении обученных планарий, было обнаружено, что памятный след у регенерирующих особей сохраняется только в тех участках тела, в которых была сохранена определенная часть нервной системы, и не сохранялся при полном отсутствии таковой (Шейман, 1984; Sheiman, Tigas, 1996). Недавние исследования подтвердили, казавшиеся в то время невероятными, выводы о наличии у планарий долговременной памяти, которая сохраняется после удаления головного ганглия и последующей его регенерации (Shomrat, Levin, 2013).

В последние десятилетия произошла продиктованная временем смена курса исследований. Новые направления связаны с появлением и внедрением в экспериментальную практику более совершенных методов – иммуноцитохимии, электронной микроскопии, флуоресцентной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, которые позволили вторгнуться в интимную физиологию клетки. Изучение стволовых клеток у высших организмов, обусловило возобновление интереса к стволовым клеткам планарий. Это, в свою очередь, привело к новому потоку научных работ по регенерации планарий. В наше время, современные работы на планариях успешно развиваются в лабораториях разных стран: в Финляндии (Reuter et al., 1995; Reuter, Kreshchenko, 2004), в Испании (Salo, Baguna, 2002; Baguna, 2009), Италии (Salvetti, et al., 2000; 2005; Isolani, et al., 2012), Великобритании (Evans, 2011), Японии (Agata, Watanabe, 1999; Ishizuka, et al., 2007), США (Newmark, Alvarado, 2000; Oviedo, Levin, 2007; Lapan, Reddien, 2011; Sanchez Alvarado, 2012), Германии (Gentile et al., 2011; Sandmann, et al., 2012), Франции (Galloni, 2012), Китае (Yuan, et al., 2011), Индии (Rangiah, Palakodeti, 2013). Широким фронтом проводятся клеточные и молекулярные исследования регенерации. Исследуется гипотеза осевой полярности и дорзо-вентрального взаимодействия в процессе формообразования у планарий (Kato, Oriti, 1999; Molina et al., 2011; Blassberg et al., 2013). Происходит накопление информации, касающейся клеточных источников регенерации, а также генов, участвующих в морфогенетических процессах. Показано, что репаративная регенерация у планарий на начальном ее этапе осуществляется путем эпиморфного формирования бластемы, из которой восстанавливаются ампутированные ткани и органы. В структурном и функциональном объединении старых и новых тканей задействован морфаллакис. Регенерационная способ-

ность обеспечивается наличием у планарий пула плюрипотентных стволовых клеток, необластов. Выявлены некоторые особенности биологии необластов, описаны их морфологические черты, исследовано распределение необластов у нескольких видов планарий (Baguna et al., 1975a, b; Newmark, Sanchez Alvarado, 2000; Baguna, 2002; Oriti et al., 2005). Обнаружено, что популяция необластов поддерживается на определенном уровне за счет их постоянной пролиферации (Newmark, Sanchez Alvarado, 2000; Крещенко, 2012; Ermakov et al., 2012). Показано, что у планарий именно потомки необластов образуют регенерационную бластему после повреждения или экспериментальной перерезки, где впоследствии дифференцируются и дают начало всем типам клеток тела: нервным, мышечным, кишечным, паренхимным, а также половым (Salo, 2006; Handelberg-Thorsager et al., 2008).

В Институте биофизики клетки РАН (г. Пушкино, Московская обл.) на протяжении последних десятилетий проводятся сравнительные исследования регенерации у планарий, происходящей после ампутации разных органов и частей тела – головного конца тела, ганглия, фоторецепторов, глотки. Изучаются регуляторные факторы морфогенеза, происходящего в ходе бесполого размножения планарий. Эти исследования на планариях являются уникальными на всей территории России и постсоветского пространства. Благодаря им, имеющиеся у планарий экспериментальные модели регенерации сейчас легко поддаются описанию с помощью доступных, адекватных количественных и качественных критериев регенерационного процесса. Обнаружено, что процессы регенерации, происходящие при восстановлении кишечника, глотки, глаз или фрагментов тела после перерезок на разных уровнях тела планарий имеют, как черты сходства, так и различия (Kreshchenko et al., 1999; Шейман и др., 2004; 2006; Крещенко, 2009; Шейман и др. 2010). Показано распределение пролиферирующих необластов в разных областях тела как интактных, так и регенерирующих планарий *Girardia tigrina* и *Schmidtea mediterranea*, изучено распределение делящихся необластов по фазам митотического цикла. В суспензии клеток, полученных из тканей регенерирующих планарий (рис. 3), исследовали динамику пролиферативной активности стволовых клеток в ходе регенерации головного ганглия, а также после воздействия блокирующими агентами – колхицином и мелатонином (Kreshchenko et al., 2008; Крещенко, 2012; Ermakov et al., 2012). Показано участие природных нейропептидов NPF и FMRF в регуляции регенерационных процессов у планарий (Kreshchenko, 2008; Kreshchenko, Maule, 2010). Выявлено влияние физических факторов – слабых электромагнитных излучений –

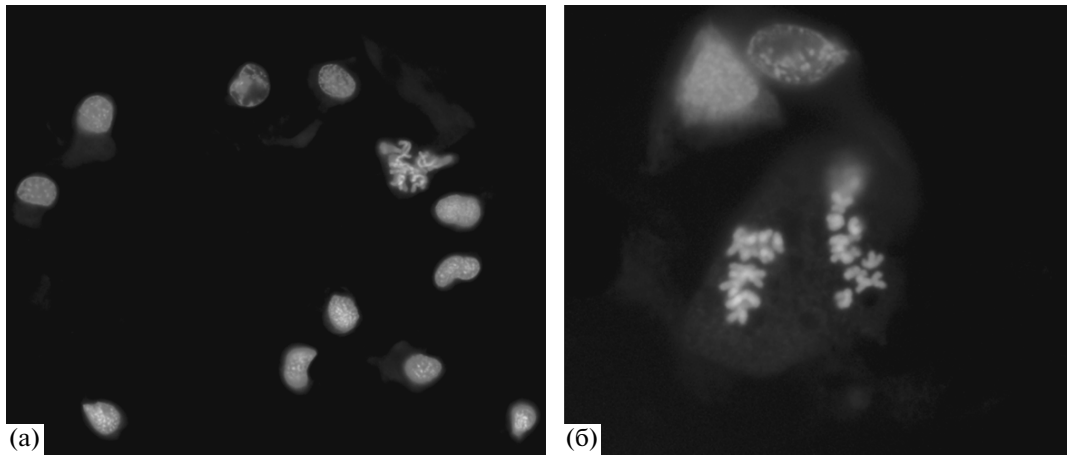


Рис. 3. Окраска ядер в суспензии клеток, полученной из тканей планарий *G. tigrina* (а) с помощью флуоресцентного красителя Hoechst33342. (а) — видны одиннадцать окрашенных ядер клеток в стадии интерфазы клеточного цикла, в правом верхнем углу — ядро делящейся клетки в стадии ранней анафазы — начала расхождения дочерних хроматид к разным полюсам ядра (объектив $\times 20$). (б) — в центре митотическая клетка (ядро) после воздействия колхицином, заметно, что хромосомы удвоились, однако расхождения хроматид не произошло, над ней расположены два интерфазных ядра (объектив $\times 63$).

на морфогенетические процессы у планарий (Шейман и др., 2009; Новиков, Шейман, 2012).

Последние 20 лет обогатили исследования новыми клеточными и молекулярными технологиями, включая генетический и геномный анализы, *in situ* гибридизацию, метод флуоресцентно-активируемого клеточного сортирования (Hayashi et al., 2006; Romero et al., 2012). Химерный анализ позволил исследовать трансплантацию ткани от одного вида планарий к другому и ее последствия (Kato et al., 1999), а введение бромдезоксисуридина — пометить и идентифицировать пролиферирующие клетки (Newmark, Sanchez Alvarado, 2000). С помощью иммуноцитохимических маркеров — специфических антител — удается изучать дифференцировку клеток в ходе регенерации у планарий (Reuter et al., 1996; Bueno et al., 1997; Agata et al., 1998; Kreshchenko et al., 1999; Kreshchenko, 2008; Cebria, 2008; Fraguas et al., 2012). Недавнее исследование позволило проследить судьбу единичной трансплантированной стволовой клетки в организме планарий (Wagner et al., 2011). Таким образом было подтверждено, что необласти — это соматические стволовые клетки, сохраняющие свойства плюрипотентности во взрослом организме.

В геноме планарий *Schmidtea mediterranea* (Robb et al., 2008), обнаружен ряд генов, среди которых гены *piwi*, *pumilio*, *bruno* и *musashi*, *vasa* и *nanos*, *argonaute-2*, *STAG*, *wnt*, принимающие то или иное участие в регуляции процессов развития (Shibata et al., 1999; Salvetti et al., 2002; Sato et al., 2006; Handberg-Thorsager, Salo, 2007; Petersen, Reddien, 2011; Yuan et al., 2011; Riddiford, Olson, 2011; Iglesias et al., 2011; Almuelo-Castilio et al., 2012; Roberts-Galbraith, Newmark, 2013; Blassberg

et al., 2013). Показано, что некоторые гены экспрессируются только в необластах, например, *piwi* (Reddien et al., 2005), другие представлены как в необластах, так и в дифференцированных клетках (*pumilio*, *bruno* и *musashi*) (Salvetti et al., 2005; Sato et al., 2006), третьи экспрессируются только в половых клетках (гомологи генов *vasa* и *nanos*) (Shibata et al., 1999; 2010; Sato et al., 2006; Wang et al., 2007). Усилиями ученых были созданы EST, геномная и протеомная базы данных нескольких видов планарий (Mineta et al., 2003; Zayas et al., 2005; Ishizuka et al., 2007; Robb et al., 2008; Abril et al., 2010; Adamidi et al., 2010; Fernandez-Taboada et al., 2011; Fraguas et al., 2011; Nishimura et al., 2012; Labbe et al., 2013), которые теперь могут использоваться учеными для определения сигнальных путей, вовлеченных в регенерационные процессы.

Применение современного метода РНК-интерференции у планарий позволило изучать функцию определенных генов в ключевых процессах развития и морфогенеза (Sanchez Alvarado, Newmark, 1999). Так, было выяснено, что РНК опосредованный нокаут генов *pumilio*, *bruno* и *piwi* у планарий приводил к гибели необластов и потере способности к регенерации. В работе Сальветти (Salvetti et al., 2005) обнаружено, что сайленсинг гена *bruno* нарушал процесс пролиферации необластов, тогда как их дифференцировка протекала нормально. Такие животные формировали нормальную бластему, но из-за ограниченного запаса необластов вскоре погибали. Сайленсинг гена *piwi* у планарий вызывал противоположный эффект — пролиферация необластов протекала нормально, но дифференцировка таких клеток была дефектна (Reddien et al., 2005). Нокаут экс-

прессии гена *nanos* с помощью РНК интерференции не влиял на регенерацию в целом, но приводил к прекращению формирования гонад у планарий, размножающихся половым путем (Handberg-Thorsager, Salo, 2007). Было установлено, что у планарий, не способных к регенерации или с ограниченной способностью к регенерации, происходит активация Wnt-сигнального пути. И, напротив, нокаут гена бета-катенина-1, являющегося участником wnt-сигнального пути, приводил к восстановлению утраченной в ходе эволюции способности к регенерации в хвостовом фрагменте тела двух видов планарий *Procytola fluviatilis* и *Dendrocoelum lacteum* (Liu et al., 2013; Sikes, Newmark, 2013). Таким образом, благодаря работам, проводимым на планариях, был достигнут определенный прогресс в регенерационных исследованиях.

Продуктами вышеупомянутых генов являются белковые молекулы – транскрипционные факторы, ферменты, гормоны и другие молекулы, играющие важную роль в регуляции морфогенетических процессов (Sebria et al., 2002; Fraguas et al., 2011; Ермакова и др., 2009). В отдельных исследованиях было выявлено, что процесс пролиферации и дифференцировки стволовых клеток у планарий может активироваться или подавляться рядом гормонов, нейропептидов, ростовых факторов и нейротрансмиттеров (Franquinet, Martelly, 1981; Baguna et al., 1989; Шейман и др., 1985; 1989; Villar, Schaeffer, 1993; Крещенко, Шейман 1994; Hori, 1997; Hori, Kishida, 2003; Reuter, Kreshchenko, 2004; Krehchenko, 2008; Ермакова, и др. 2009; Fraguas et al., 2011). Впоследствии рядом исследователей было обнаружено, что гены и белки, играющие ключевую роль в регуляции процессов регенерации тканей, пролиферации и дифференцировки стволовых клеток и морфогенеза, имеют высокую степень гомологии с аналогичными генами и белками у высших животных (Oviedo, Levin, 2007; Onal et al., 2012; Labbe et al., 2013).

Несмотря на все усилия ученых, в изучении регенерации у планарий остается немало нерешенных проблем. Например, не увенчались успехом усилия по созданию долгоживущей культуры стволовых клеток планарий *in vivo*. Механизмы функционирования системы стволовых клеток планарий изучаются, но четко не определены. Триггерные механизмы регенерации остаются неизвестными. Общей теории, объясняющей феномен регенерации на данный момент – не существует. В настоящее время научное сообщество нуждается в анализе и осмыслении полученных результатов, и создании единой теории, которая бы свела воедино все накопленные сведения и объяснила механизмы запуска и реализации процессов восстановления у планарий, включая сложный комплекс событий – от экспрессии нужных генов до пролиферации стволовых кле-

ток и дифференцировки их потомков и формирования полноценного функционирующего органа. По нашему глубокому убеждению, изучение основ регенерационных способностей, а также механизмов жизнедеятельности, функционирования и регуляции стволовых клеток у планарий, является необходимым условием для успешного использования полученной информации и обеспечения контролируемой и направленной дифференцировки эмбриональных стволовых клеток у высших животных и человека, безопасного практического их применения в биологии и медицине. Кроме того, использование беспозвоночных в качестве экспериментальных объектов имеет целый ряд преимуществ. Их добывание и содержание доступны по материальным соображениям, на них возможна постановка множественных экспериментов, удовлетворяющих любую статистику. Наконец, они позволяют исключить вивисекцию и соблюсти этический фактор. При этом следует помнить слова одного из основоположников молекулярной биологии, Уотсона: “Что верно для *Esherichia coli*, то верно и для слона”.

Поддержано грантом РФФИ (№ 12-04-01086а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

- Ермакова О.Н., Ермаков А.М., Тирас Х.П., и др. Ретиноевая кислота, как регулятор морфогенеза планарий // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 6. С. 449–455.
- Крещенко Н.Д., Шейман И.М. Регенерация глотки у планарий: Влияние нейропептидов // Онтогенез. 1994. Т. 25. № 6. С. 350–356.
- Крещенко Н.Д. Регенерация глотки у планарий // Онтогенез. 2009. Т. 40. № 1. С. 3–18.
- Крещенко Н.Д. Соотношение стадий митотического цикла в популяции пролиферирующих стволовых клеток планарий *Girardia tigrina* // Биол. мембр. 2012. Т. 29. № 5. С. 354–361.
- Новиков В.В., Шейман И.М. Влияние комбинированных магнитных полей, настроенных на ион-циклотронный резонанс для иона кальция, на интенсивность деления у планарий // Биофизика. 2012. Т. 57. № 2. С. 346–349.
- Тирас Х.П., Шейман И.М., Сахарова Н.Ю. Активность АХЭ в нервной системе некоторых триклаид (класс ресничных червей) // Журн. эволюц. биохим. физиол. 1975. Т. 11. № 4. С. 427–429.
- Токин Б.П. Регенерация и соматический эмбриогенез. Л.: Изд-во ЛГУ, 1959. 268 с.
- Шейман И.М. Регуляторы морфогенеза и их адаптивная роль. М.: Наука, 1984. 174 с.
- Шейман И.М., Тирас Х.П., Виноградов В.А., и др. Аналог энкефалина – даларгин ускоряет регенерацию у планарий // Докл. Акад. Наук СССР. 1985. Т. 284. № 2. С. 481–483.
- Шейман И.М., Тирас Х.П., Балобанова Э.Ф. Морфогенетическая функция нейропептидов // Физиологический журнал. 1989. Т. 75. № 5. С. 619–626.

- Шейман И.М., Седельников З.В., Крещенко Н.Д. Ресурсы регенерации у планарий // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 1. С. 27–31.
- Шейман И.М., Крещенко Н.Д., Нетреба М.В. Формирование функции фоторецепторной системы на ранних этапах развития // Биофизика. 2010. Т. 55. № 4. С. 680–685.
- Шейман И.М., Новиков В.В., Крещенко Н.Д. Слабые воздействия физических и химических факторов на морфогенетический процесс (у беспозвоночных) // Биофизика. 2009. Т. 54. № 6. С. 1114–1119.
- Abril J.F., Cebria F., Rodríguez-Esteban G., et al. Smed454 dataset: unravelling the transcriptome of *Schmidtea mediterranea* // BMC Genomics. 2010. V. 11. P. 731. doi: 10.1186/1471-2164-11-731.
- Adamidi C., Wang G.Y., Mastrobuoni G., et al. De novo assembly and validation of planaria transcriptome by massive parallel sequencing and shotgun proteomics // Genome Res. 2011. V. 21. P. 1193–1200.
- Agata K., Soejima Y., Kato K. et al. Structure of the planarian central nervous system (CNS) revealed by neuronal cell markers // Zool Sci. V. 15. P. 433–440. doi: 10.2108/zsj.15.433
- Agata K., Watanabe K. Molecular and cellular aspects of planarian regeneration // Semin. Cell. Dev. Biol. 1999. V. 10. № 4. P. 377–383.
- Almuedo-Castilio M., Sureda-Gomez M., Adell T. Wnt signaling in planarians: new answer to old questions // Int. J. Dev. Biol. 2012. V. 56. P. 53–65.
- Baguna J. Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranean* sp. I. Mitotic studies during growth, feeding and starvation // J. Exp. Zool. 1975a. V. 195. P. 53–64.
- Baguna J. Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea*. II. Mitotic studies during regeneration and possible mechanism of blastema formation // J. Exp. Zool. 1975b. V. 195. P. 65–80.
- Baguna J., Salo E., Romero R. Effects of activators and antagonists of the neuropeptides substance P and substance K on cell proliferation in planarians // Int. J. Dev. Biol. 1989. V. 33. № 2. P. 261–266.
- Baguna J. A history of Evo-Devo research in Spain // Int. J. Dev. Biol. 2009. V. 53. № 8–10. P. 1205–1217.
- Best J.B., Abelein V., Kreutzer E. et al. Cephalic mechanism for social control of fissioning in planarians. III. Central nervous system centers of facilitation in inhibition // J. Comp. Physiol. Psychol. 1975. V. 89. P. 923–932.
- Blassberg R.A., Felix D.A., Tejada-Romero B. et al. PBX/extradenticle is required to re-establish axial structures and polarity during planarian regeneration // Development. 2013. V. 140 № 4. P. 730–739.
- Brondsted H.V. Planarian regeneration. Oxford: Pergamon Press. 1969. 276 p.
- Bueno D., Baguna J., Romero R. Cell-, tissue-, and position-specific monoclonal antibodies against the planarian *Dugesia (Girardia) tigrina* // Histochem. Cell. Biol. 1997. V. 107. № 2. P. 139–149.
- Cebria F., Kobayashi C., Umesono Y. FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians // Nature. 2002. V. 419. № 6907. P. 620–624.
- Cebria F. Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: an immunocytochemical study // Neurosci. Res. 2008. V. 61. № 4. P. 375–384.
- Child C. M. Patterns and problems of development. Chicago: Univ. Press, 1941. 799 p.
- Darwin Ch. Brief description of several terrestrial planarian and some marine species // Ann. Mag. Natur. Hist., 1884. V. 14. P. 241.
- Eriksson K.S., Panula P. Gamma-Aminobutyric acid in the nervous system of a planarian // J. Comp. Neurol. 1994. V. 345. № 4. P. 528–536.
- Ermakov A.M., Ermakova O.N., Kudravcev A.A. et al. Study of planarian stem cell proliferation by means of flow cytometry // Molecular Biology Report. 2012. V. 39. № 3. P. 3073–3080.
- Evans D.J., Owlarn S., Romero B.T., Chen C., Aboobaker A.A. Combining classical and molecular approaches elaborates on the complexity of mechanisms underpinning anterior regeneration // PLoS One. 2011. V. 6. № 11. e27927.
- Fernandes-Taboda E., Rodríguez-Esteban G., Saló E., Abril J.F. A proteomics approach to decipher the molecular nature of planarian stem cells // BMC Genomics. 2011. V. 12. P. 133. doi: 10.1186/1471-2164-12-133
- Fraguas S., Barberan S., Cebria F. EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis // Dev. Biol. 2011. V. 354. № 1. P. 87–101.
- Fraguas S., Barberan S., Ibarra B., et al. Regeneration of neuronal cell types in *Schmidtea mediterranea*: an immunohistochemical and expression study // Int. J. Dev. Biol. 2012. V. 56. P. 19–37. doi: 10.1387/ijdb.113463jb
- Franquinet R., Martelly I. Effects of serotonin and catecholamines on RNA synthesis in planarians; *in vitro* and *in vivo* studies // Cell Differ. 1981. V. 10. № 4. P. 201–209.
- Galloni M. Global irradiation effects, stem cell genes and rare transcripts in the planarian transcriptome // Int. J. Dev. Biol. 2012. V. 56. P. 103–116. doi: 10.1387/ijdb.113455mg
- Gentile L., Cebria F., Bartscherer K. The planarian flatworm: an *in vivo* model for stem cell biology and nervous system regeneration // Dis. Model. Mech. 2011. V. 4. № 1. P. 12–19.
- Handberg-Thorsager M., Salo E. The planarian nanos-like gene *Smednos* is expressed in germline and eye precursor cells during development and regeneration // Dev. Genes Evol. 2007. V. 217. № 5. P. 403–411.
- Hayashi T., Asami I.M., Higuchi S. et al. Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescence-activated cell sorting // Dev. Growth. Differ. 2006. V. 48. P. 371–380.
- Hori I. Cytological approach to morphogenesis in planarian blastema. I. Cell behavior during blastema formation // J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 1992. V. 24. № 1. P. 75–84.
- Hori I. Cytological approach to morphogenesis in the planarian blastema. II. The effect of neuropeptides // J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 1997. V. 29. P. 91–97.
- Hori I., Kishida Y. Quantitative changes in nuclear pores and chromatoid bodies induced by neuropeptides during differentiation in the planarian *Dugesia japonica* // J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 2003. V. 35. P. 439–444.
- Johnston R. N., Shaw C., Halton D.W. et al. GYIRFamide: a novel FMRFamide-related peptide (FaRP) from the

- triclad turbellarian, *Dugesia tigrina* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. V. 209. P. 689–697.
- Johnston R.N., Shaw C., Halton D.W. et al. Isolation, localization, and bioactivity of the FMRFamide-related neuropeptides GYIRFamide and YIRFamide from marine turbellarian *Bdelloura candida* // Journal of Neurochemistry. 1996. V. 67. P. 814–821.
- Iglesias M., Almuedo-Castillo M., Aboobaker A.A. et al. Early planarian brain regeneration is independent of blastema polarity mediated by the Wnt/ β -catenin pathway // Dev. Biol. 2011. V. 358. № 1. P. 68–78.
- Ishizuka H., Maezawa T., Kawauchi J. et al. The *Dugesia ryukyuensis* database as a molecular resource for studying switching of the reproductive system // Zool. Sci. 2007. V. 24. P. 31–37.
- Isonani M.E., Conte M., Deri P., Batistoni R. Stem cell protection mechanisms in planarians: the role of some heat shock genes // Int. J. Dev. Biol. 2012. V. 56. P. 127–133. doi: 10.1387/ijdb.113432mi
- Kabotyanski E.A., Nezhlin L.P., Sakharov D.A. Serotonin neurons in planarian pharynx // Stud. Neurosci. 1991. V. 13. P. 138–152.
- Kato K., Orii H., Watanabe K., Agata K. The role of dorso-ventral interaction in the onset of planarian regeneration // Development. 1999. V. 126. P. 1031–1040.
- Kobayashi K., Hoshi M. Sex-inducing effect of a hydrophilic fraction on reproductive switching in the planarian *Dugesia ryukyuensis* (Seriata, Tricladida) // Front. Zool. 2011. V. 8. P. 23.
- Kreshchenko N., Reuter M., Sheiman I. et al. Relationship between musculature and nervous system in the regenerating pharynx in *Dugesia tigrina* (Plathelminthes) // Invertebrate. Reproduction and Development. 1999. V. 35. № 2. P. 109–125.
- Kreshchenko N., Sedelnikov Z., Sheiman I. et al. The effects of neuropeptide F on regeneration in *Girardia tigrina* (Platyhelminthes) // Cell and Tissue Research. 2008. V. 331. № 3. P. 739–750.
- Kreshchenko N. Functions of flatworm neuropeptides NPF, GYIRF and FMRF in course of pharyngeal regeneration of anterior body fragments of planarian, *Girardia tigrina* // Acta Biologica Hungarica 2008. V. 59. P. 199–207.
- Kreshchenko N.D., Maule A.G. Multiple functions of neuropeptides NPF and FMRF in planarian // Regulatory peptides. 2010. V. 164. № 1. P. 36.
- Kreshchenko N.D., Tolstikov O.O. Some aspects of immunolocalization of FMRFamide in the nervous systems of turbellarians *Polycelis tenuis* and *Girardia tigrina* // Acta Biologica Hungarica. 2012. V. 63. № 2. P. 209–213.
- Labbe R., Irimia M., Currie K.W. et al. A Comparative Transcriptomic Analysis Reveals Conserved Features of Stem Cell Pluripotency in Planarians and Mammals // Stem cells. 2012. V. 30. P. 1734–1745.
- Lapan S.V., Reddien P.W. dlx and sp6-9 control optic cup regeneration in a prototypic eye // PLoS Genetics. 2011. V. 7. № 8. e1002226.
- Lender Th. La regeneration des planaires. In: Regeneration in animals and related problems. Amsterdam. North-Holl. Publ. Co., 1965. P. 95–111.
- Liu S.Y., Seleck C., Fridrich B. et al. Reactivating head re-grows in a regeneration-deficient planarian species. Nature. 2013. V. 500. № 7460. P. 81–84.
- Maule A.G., Shaw C., Halton D.W. et al. RYIRFamide: turbellarian FMRFamide-related peptide (FaRP) // Regul. Pept. 1994. V. 50. P. 37–43.
- McConnell J.V. Specific factors influencing planarian behavior. In: Chemistry of Learning, N-Y, Plenum Press. 1967. P. 217–233.
- Mineta K., Nakazawa M., Cebria F. et al. Origin and evolutionary process of the CNS elucidated by comparative genomics analysis of planarian ESTs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 7666–7671.
- Molina M.D., Salo E., Cebria F. Organizing the DV axis during planarian regeneration // Communicative and Integrative Biology. 2011. V. 4. № 4. P. 498–500.
- Morgan T.H. Regeneration. N.Y.: MacMillan Co., 1901. 3162 p.
- Newmark P.A., Sanchez Alvarado A. Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians // Dev. Biol. 2000. V. 220. P. 142–153.
- Nishimura K., Kitamura Y., Inoue T. et al. Reconstruction of dopaminergic neural network and locomotion function in planarian regenerates // Dev. Neurobiol. 2007. V. 67. № 8. P. 1059–1078.
- Nishimura O., Hirao Y., Agata K. Comparative transcriptome analysis between planarian *Dugesia japonica* and other platyhelminth species // BMC Genomics. 2012. V. 13. P. 289.
- Onal P., Grun D., Adami C. et al. Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells // The EMBO Journal. 2012. V. 31. P. 2755–2769.
- Orii H., Sakurai T., Watanabe K. Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian *Dugesia japonica* // Dev. Genes Evol. 2005. V. 215. № 3. P. 143–157.
- Oviedo N., Levin M. Smedinx-11 is a planarian stem cell gap junction gene required for regeneration and homeostasis // Development. 2007. V. 134. P. 3121–3131.
- Pedersen K.J. Cytological studies on the planarian neoblasts // Z. Zellforsch. 1959. V. 50. P. 799–817.
- Petersen C.P., Reddien P.W. Polarized notum activation at wounds inhibits Wnt function to promote planarian head regeneration // Science. 2011. V. 332. № 6031. P. 852–855.
- Rangiah K., Palakodeti D. Comprehensive analysis of neurotransmitters from regenerating planarian extract using an ultrahigh-performance liquid chromatography/mass spectrometry/selected reaction monitoring method // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2013. V. 27. № 21. P. 2439–2452.
- Reddien P.W., Oviedo N.J., Jennings J.R. et al. SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells // Science. 2005. V. 310. P. 1327–1330.
- Reuter M., Gustafsson M.K.S., Sahlgren C. et al. The nervous system of Tricladida. I. Neuroanatomy of *Procerodes littoralis* (Maricola, Procerodidae) an immunocytochemical study // Invertebrate Neuroscience. 1995. V. 1. P. 113–122.
- Reuter M., Kreshchenko N.D. Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration // Canadian Journal of Zoology. 2004. V. 82. № 2. P. 334–356.

- Riddiford N., Olson P.D. Wnt gene loss in flatworms // *Dev. Genes. Evol.* 2011. V. 221. № 4. P. 187–197.
- Robb S.M., Ross E., Sanchez Alvarado A. SmedGD: the *Schmidtea mediterranea* genome database // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36 (Database issue): D599–606.
- Roberts-Galbraith R., Newmark P.A. Follistatin antagonizes activin signaling and acts with notum to direct planarian head regeneration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 4. P. 1363–1368.
- Romero B.T., Evans D.J., Aboobaker A.A. FACS analysis of the planarian stem cell compartment as a tool to understand regenerative mechanisms // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 916. P. 167–179.
- Salo E., Baguna J. Regeneration in planarians and other worms: new findings, new tools and new perspectives // *J. Exp. Zool.* 2002. V. 292. P. 528–539.
- Salo E. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes) // *BioEssays.* 2006. V. 28. P. 546–559.
- Salvetti A., Rossi L., Deri P. et al. An MCM2-related gene is expressed in proliferating cells of intact and regenerating planarians. *Dev. Dyn.* 2000. V. 218. P. 603–614.
- Salvetti A., Rossi L., Lena A. et al. DjPum, a homologue of *Drosophila pumilio*, is essential to planarian stem cell maintenance // *Development.* 2005. V. 132. P. 1863–1874.
- Sakharova N.Yu., Sheiman I.M. The propagation of food particles in the planarian body // *Comp. Biochem. Physiol. A.* 1977. V. 58. P. 427–431.
- Sanchez Alvarado A., Newmark P.A. Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 9. P. 5049–5054.
- Sanchez Alvarado A. 2012. Q&A: what is regeneration, and why look to planarians for answers? // *BMC Biol.* 2012.10. P. 88. doi: 10.1186/1741-7007-10-88
- Sandmann T., Vogg M.C., Owlarn C. et al. The head-regeneration transcriptome of the planarian *Schmidtea mediterranea* // *Genome Biology.* 2011. V. 12. R76. <http://genomebiology.com/2011/12/8/R76>
- Sasidharan V., Lu Y.-C., Banzal D. et al. Identification of neoblast- and regeneration-specific miRNAs in the planarian *Schmidtea mediterranea* // *RNA.* 2013. V. 19. № 10. P. 1–11.
- Sato K., Shibata N., Orii H. et al. Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of nanos-related gene in planarians // *Dev. Growth. Differ.* 2006. V. 48. P. 615–628.91.
- Sikes J.M., Newmark P.A. Restoration of anterior regeneration in planarian with limited regenerative ability // *Nature.* 2013. V. 500. № 7460. P. 77–80.
- Sheiman I.M., Sakharova N.Yu. On a peculiarity of planarian digestion // *Comp. Biochem. Physiol. A.* 1974. V. 48. P. 601–607.
- Sheiman I.M., Tiras Kh.P. Memory and Morphogenesis in Planaria and Beetles // In: *Russian Contributions to Invertebrate Behavior.* Westport (Connecticut): Praeger, 1996. P. 43–76
- Shibata N., Umesono Y., Orii H. et al. Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians // *Dev. Biol.* 1999. V. 206. № 1. P. 73–87.
- Shomrat T., Levin M. An automated training paradigm reveals long-term memory in planarians and its persistence through head regeneration // *J. Exp. Biol.* 2013. V. 216. № 20. P. 3799–3810. doi: 10.1242/jeb.087809
- Villar D., Schaeffer D.J. Morphogenetic action of neurotransmitters on regenerating planarians—a review // *Biomed. Environ. Sci.* 1993. V. 6. P. 327–347.
- Wagner D.E., Wang I.E., Reddien P.W. Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration // *Science.* 2011. V. 332. P. 811–816.
- Wang Y., Zayas R.M., Guo T. et al. Nanos function is essential for development and regeneration of planarian germ cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 5901–5906.
- Welsh J.H., Williams L.D. Monoamine containing neurons in planaria // *J. Comp. Neurol.* 1970. V. 138. P. 103–106.
- Wolff E. Recent researches on the regeneration of planaria // In: *Regeneration.* N.Y.: Ronald Press, 1962. P. 53–84.
- Yuan Z.Q., Zhao B.S., Zhang J.Y. Expression patterns of the STAG gene in intact and regenerating planarians (*Dugesia japonica*) // *Genet. Mol. Res.* 2011. V. 10. № 1. P. 410–418.
- Zayas R.M., Hernandez A., Habermann B., et al. The planarian *Schmidtea mediterranea* as a model for epigenetic germ cell specification: analysis of ESTs from the hermaphroditic strain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 51. P. 18491–18496.
- Zeng A., Li Y.Q., Wang C., et al. Heterochromatin protein 1 promotes self-renewal and triggers regenerative proliferation in adult stem cells // *J. Cell. Biol.* 2013. V. 210. № 3. P. 409–425.

Regeneration of Planarians: Experimental Object

I. M. Sheiman[†] and N. D. Kreshchenko

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia
e-mail: nkreshch@rambler.ru

Received December 19, 2012; in final form, January 27, 2014

Abstract—We discuss the expediency of using invertebrates, such as flatworms and planarians, as experimental objects. Free-living planarian flatworms (phylum Platyhelminthes, class Turbellaria) are invertebrate animals in which a bilateral symmetry appears for the first time in evolution and organs and tissues form. As the highest ecological link of the food chain—predators—these animals are characterized by a set of behavioral reactions controlled by a differentiated central nervous system. Planarians have unsurpassed ability to regen-

erate lost or damaged body parts. Owing to the ease of their breeding and their convenience for manipulations, these animals are used to study the influence of chemical and physical factors on the processes of life, growth, and reproduction. Currently, planarians are recognized as a model for biological research in the field of regeneration, stem cell biology, study of their proliferation and differentiation, as well as the regulatory mechanisms of morphogenetic processes. The genome of the planarian *Schmidtea mediterranea* was fully sequenced, which opened up the opportunity to work with this object at the molecular biological level. Furthermore, planarians are used in neurobiological and toxicological studies, in studying the evolutionary aspects of centralization of the nervous system, mechanisms of muscle contraction, and in the development of new antiparasitic drugs. This review aims to demonstrate the relevance and diversity of research conducted on simple biological objects—planarians—to a wider audience to show the historical continuity of these studies and their wide geographical distribution and to focus on the studies carried out in Russia, which, as a rule, are not included in the foreign reviews on planarian regeneration.

Keywords: invertebrates, planarian, regeneration, morphogenesis, stem cells