

СОБСТВЕННАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ НЕОБЛАСТОВ ПЛАНАРИИ В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ

© 2015 г. Х.П. Тирас* **, С.В. Гудков* ** *** ****,
В.И. Емельяненко* *****, К.Б. Асланиди*

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

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

***Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 38;

****Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23;

*****Институт биологического приборостроения РАН,
142290, Пуцино Московской области, Институтская ул., 7

E-mail: kbaslanidi@gmail.com

Поступила в редакцию 06.08.15 г.

Исследованы кинетики люминесценции, индуцированной активными формами кислорода у планарий в процессе регенерации. Установлено, что регенерация сопровождается изменениями концентрации активных форм кислорода, коррелирующими с энергозатратными процессами, такими как окислительный стресс, вызванный повреждениями клеточных мембран при расчлениении планарии, фагоцитоз погибающих клеток и митоз неопластов. Впервые показана возможность регистрации физиологического состояния плюрипотентных стволовых клеток на уровне организма *in vivo*.

Ключевые слова: активные формы кислорода, хемилюминесценция, планария, регенерация, неопласт, апоптоз, фагоцитоз, митоз.

По данным PubMed количество публикаций по ключевым словам «reactive oxygen species» за последние 20 лет выросло более чем в четыре раза и превысило 158000. Активные формы кислорода (АФК) в клетках образуются в процессе нормального аэробного клеточного метаболизма и в результате воздействий на организм факторов окружающей среды, таких как ионизирующие и УФ-излучения, ксенобиотики и др [1–3]. АФК играют двоякую роль в клетках, тканях и органах. С одной стороны, АФК участвуют во многих патологических процессах, таких как нейродегенеративные изменения, кардиоваскулярные нарушения и онкологические заболевания. С другой стороны, АФК необходимы для нормальной жизнедеятельности, в частности, АФК принимают непосредственное участие в процессах регенерации. При этом определенные клетки дифференцируются или дедифференцируются, либо вступают в митотический цикл, либо входят в апоптоз и само-

устраиваются [4]. Показано, что механизмы регенерации у различных животных, от дрозофилы до гидры, планарий, данио рерио и даже мышей, имеют много общего. У всех перечисленных животных механическая травма сопровождается некрозом и/или апоптозом поврежденных клеток, фагоцитозом, пролиферацией, первичной специализацией и/или миграцией плюрипотентных стволовых клеток. Поврежденные клетки высвобождают АФК, которые вызывают у эффекторных клеток активацию MAPK- и/или JNK-путей внутриклеточной сигнализации [5]. Классической моделью для изучения процесса регенерации и биологии стволовых клеток признаны пресноводные планарии [6,7]. При этом роль АФК в жизнедеятельности планарий изучена очень фрагментарно. Целью работы было исследование кинетики АФК-индуцированной люминесценции у планарий в процессе регенерации. Установлено, что регенерация сопровождается изменениями концентрации АФК, коррелирующими с энергозатратными процессами, такими как окислительный стресс, вызванный повреждениями кле-

Сокращение: АФК – активные формы кислорода.

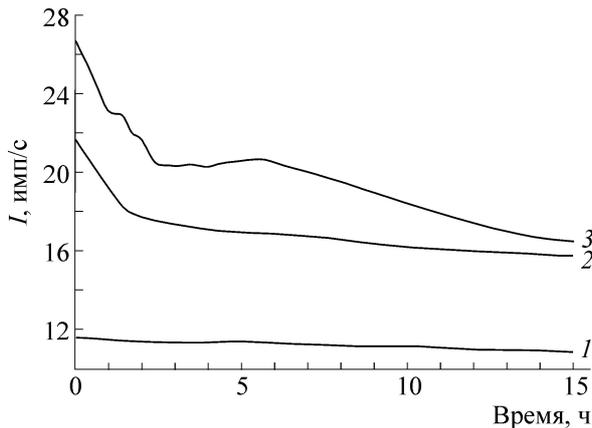


Рис. 1. Кинетики хемилюминесценции. По вертикали – интенсивность хемилюминесценции I , имп/с, по горизонтали – время, ч. 1 – Интенсивность хемилюминесценции, зарегистрированная от 10 мл чистой воды, 2 – интенсивность хемилюминесценции, зарегистрированная от 30 интактных планарий, помещенных в 10 мл чистой воды, 3 – интенсивность хемилюминесценции, зарегистрированная от тех же 30 планарий, помещенных в 10 мл чистой воды сразу после декапитации.

точных мембран при рассечении планарии, фагоцитоз погибающих клеток и митоз необластов. Более того, полученные данные позволяют предположить, что митоз у двух популяций необластов разделен по времени.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах применялась бесполоя раса пресноводных червей – планарий *Dugesia (Girardia) tigrina*. Планарий содержали в аквариумной воде при жесткости около 3–5 мг-экв/литр, pH 6,5 и температуре 26°C. Кормили личинками двукрылых. Для экспериментов отбирали животных длиной около 10–11 мм после недельного голодания. Регенерацию вызывали ампутацией головной части планарии на уровне «глаз» [8]. В каждой серии экспериментов интактных планарий или их фрагменты помещали в 10 мл воды внутри специальных полипропиленовых сцинтилляционных кювет (Beckman, USA). Для измерения люминесценции использовали хемилюминометр Биотокс-7А 2М (АНО «Инженерный центр – экология», Россия). Прибор оснащен фотоумножителем 9750QB/1 (9750QB/1, EMI Electronics LTD, Middlesex, UK), область спектральной чувствительности составляет 380–710 нм. Измерения проводили при температуре $26,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$, в режиме счета фотонов с интервалом записи данных 1 с. Полученные зависимости сглаживали с использованием программного продукта SigmaPlot 8.0

с помощью функции smooth 2D Data. Частота сеплирования сигналов после сглаживания превышала 5 мин. Для анализа люминесцентного сигнала, вызванного травмированием планарии, использовали разность кинетик люминесценции интактных планарий и тех же особей после рассечения. Полученную разностную кривую анализировали используя программу, основанную на методе Маркуардта [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Регистрировали зависимость хемилюминесценции 10 мл чистой воды, 30 особей интактных планарий, помещенных в 10 мл чистой воды, и тех же 30 особей после декапитации, помещенных в 10 мл чистой воды (рис. 1). Время непрерывной регистрации люминесценции составляло 15 ч.

Анализ полученных зависимостей позволяет заключить, что уровень хемилюминесценции воды, регистрируемый системой, составляет в среднем 10–11 импульсов в секунду. На этом фоне все регистрируемые кинетики демонстрируют затухание хемилюминесценции в течение времени регистрации:

1. Изменения хемилюминесценции чистой воды незначительно изменяется во времени.

2. Сигнал хемилюминесценции, регистрируемый от 30 интактных планарий, помещенных в 10 мл чистой воды, почти в два раза превысил сигнал, регистрируемый от чистой воды, и за 15 ч уменьшился почти на 20%.

3. Сигнал хемилюминесценции, регистрируемый от 30 декапитированных планарий, помещенных в 10 мл чистой воды, примерно в два раза превысил сигнал, регистрируемый от чистой воды, а за 15 ч уменьшился более чем на 40%.

Полученные результаты позволяют выявить различные источники хемилюминесценции.

Кривая 1 на рис. 1 описывает хемилюминесценцию воды и присутствует во всех полученных кинетиках. Известно, что источником свободных радикалов в чистой воде являются молекулы растворенного кислорода. В чистой воде, насыщенной атмосферным воздухом, при используемой в эксперименте температуре 26°C происходит регистрируемое образование активных форм кислорода [10,11].

Кривая 2 на рис. 1 описывает хемилюминесценцию воды и хемилюминесценцию интактных планарий, а разность кинетик 1 и 2 определяет изменения хемилюминесценции интактных планарий. Известно, что главным источником всех радикалов в нормально функцио-

нирующих клетках служит реакция одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода, приводящая к образованию супероксиданион-радикала. Супероксиданион-радикал образуется НАДФН-оксидантным комплексом клеточных мембран: цитоплазматической мембраны, мембраны эндоплазматического ретикулума и внутренней мембраны митохондрий [4,12]. Во всех случаях активация НАДФН-оксидантного комплекса связана с функциональной нагрузкой и деполяризацией соответствующих мембран, что особенно сильно проявляется при развитии окислительного стресса. Вторым источником свободных радикалов в живых клетках является монооксид азота NO, образуемый разными NO-синтетазами. В норме в организме по разным оценкам от 2 до 30% потребляемого кислорода преобразуется в АФК. Повышение функциональной нагрузки, в частности двигательной активности, приводит к резкому росту производства АФК. Отметим, что на ярком свете при отборе и помещении в сцинтилляционную кювету планарии активно двигались, что приводило к увеличению количества АФК, а после помещения в темноту измерительной камеры люминометра – успокаивались и регистрируемый уровень хемилюминесценции медленно падал.

Кривая 3 на рис. 1 описывает хемилюминесценцию воды и хемилюминесценцию декапитированных планарий, а разность кинетик 3 и 2 определяет изменения хемилюминесценции, вызванные травмой. У декапитированных планарий, по сравнению с интактными, количество источников свободных радикалов резко возросло. Нарушение плазматических мембран приводило к развитию окислительного стресса, который обычно проявляется в накоплении продуктов окисления липидов, белков и поврежденных оснований ДНК, а также в снижении уровня антиоксидантов и повышенной восприимчивостью липидов мембран и липопротеинов к действию прооксидантов, включая ионы Fe^{2+} или H_2O_2 [4,12]. Кроме того, хемилюминесценция могла возникать при взаимодействии белка или отдельных аминокислот с пероксинитритом (NO). Установившееся значение хемилюминесценции у травмированных планарий также существенно превосходило соответствующие значения у интактных животных и чистой воды. Это означает, что травма активирует механизмы регенерации, длительность которых превышает длительность «успокоения» после нормальной двигательной активности, регистрируемой у интактных планарий после помещения в сцинтилляционную кювету.

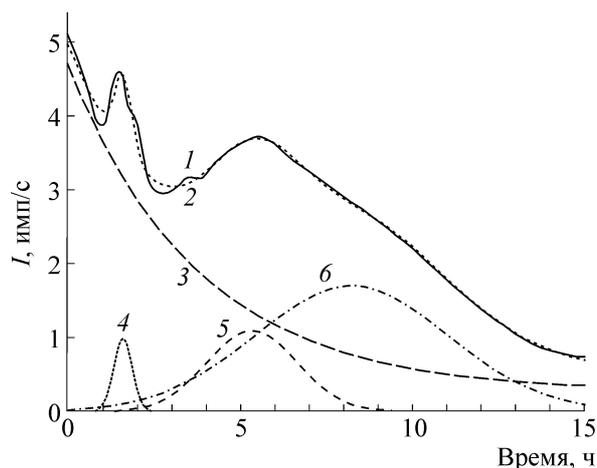


Рис. 2. Разность кинетик хемилюминесценции травмированных и интактных планарий. По вертикали – разность кинетик хемилюминесценции ΔI , имп/с, по горизонтали – время, ч. 1 – Разность кинетик хемилюминесценции, полученная в эксперименте; 2 – сумма четырех отдельных подобранных функций; 3 – затухающая экспонента $\Delta I = 4,45 \exp^{-2,77 t} + 0,62$; 4 – нормальное распределение $\Delta I = 1,16 \exp(-\ln 2((t - 1,63)/0,41)^2)$; 5 – нормальное распределение $\Delta I = 1,41 \exp(-\ln 2((t - 5,11)/1,85)^2)$; 6 – нормальное распределение $\Delta I = 1,78 \exp(-\ln 2((t - 8,26)/3,21)^2)$. Величина среднеквадратичного отклонения между экспериментальной и вычисленной кривой не превышает 1,5%.

Полученные результаты подтверждают, что интенсивность хемилюминесценции определяет функциональное состояние планарий в сцинтилляционной кювете [4]. Более того, тот факт, что до 30% биомассы планарий составляют необласты, активирующиеся после травмы [13], позволяет заключить, что регистрируемые в наших экспериментах кинетики АФК-индуцированной хемилюминесценции в значительной степени определяются физиологической активностью этих плюрипотентных стволовых клеток.

Таким образом, на основании анализа кривых на рис. 1 можно заключить, что интенсивность хемилюминесценции необластов у декапитированных планарий (3) существенно выше свечения интактных особей (2) и свечения воды (1), что позволяет анализировать активность клеточных механизмов, которые запускаются непосредственно после нанесения травмы. Постравматический люминесцентный сигнал на рис. 2 был получен как разность кинетик интактных планарий (2) и тех же особей после декапитации (3). Параметры затухающей экспоненты и трех кривых распределений Гаусса определяли используя программу, основанную на методе Маркуардта [9], минимизируя функционал: $S = (I_{\text{эсп}} - I(t))^2$, где $I_{\text{эсп}}$ – эксперимен-

тально полученная разность кинетик хемилюминесценции, $I(t)$ – функция, описывающая разность кинетик, t – время после помещения препарата в камеру люминометра. Разность кинетик хемилюминесценции, представленных на рис. 2, описывали функцией вида: $I(t) = A_0 \exp(-t/t_0) + B + \sum_i A_i \exp(-\ln 2((t_i - t)/\sigma_i)^2)$, $i = 1, 2, 3$, где A_0 – начальное значение интенсивности люминесценции, t_0 – постоянная времени затухания, B – установившееся значение, A_i – максимальное значение, t_i – положение максимума, $2\sigma_i$ – полуширина нормального распределения.

Кривая 3 на рис. 2, описываемая затухающей экспонентой $\Delta I = 4,45 \exp^{-2,77t} + 0,62$, демонстрирует, что со временем, благодаря излучательной дезактивации нестойких перекисей, образовавшихся при окислении различных органических субстратов в погибающих и травмированных клетках [4], интенсивность хемилюминесценции, вызванной травмированием планарий, падала в наших экспериментах с постоянной времени порядка 2,8 ч. Действительно, механическое травмирование планарии связано с нарушением плазматических мембран клеток, прилегающих к раневой поверхности, утечкой ионов калия в межклеточную среду и деполяризацией неповрежденных мышечных клеток, что приводит к сокращению мышц и закрытию раны в течение нескольких минут [14,15]. Более того, наличие щелевых межклеточных контактов позволяет деполяризации распространиться на расстояние до 0,5 мм [16]. Учитывая, что ширина экспериментальных планарий (длиной около 10 мм) не превышала 1,0 мм, а любое поперечное сечение планарии приводит к повреждению нервных стволов, которые тянутся вдоль всего тела, можно ожидать, что травма приведет к распространению волны деполяризации по всему телу планарии. Деполяризация, распространяющаяся через щелевые контакты от механически поврежденных клеток, приводит к изменению ионного состава интактных клеток, в частности, происходит увеличение внутриклеточной активности ионов натрия и кальция, а также уменьшение концентрации внутриклеточного калия [16–18]. Развивающийся окислительный стресс вызывает специфическую активацию гена JNK стресс-активируемой протеинкиназы (SAPK), которая относится к большому семейству из митоген-активированных протеинкиназ (MAPKs). Эта JNK-киназа модулирует экспрессию генов, связанных с травмой, в частности, индуцирует развитие апоптической гибели клеток [15]. Отметим, что развитие окислительного стресса происходит одинаковыми путями вне зависимости от вызвавшей его причины [19]. На клеточном уровне окислительный

стресс вызывает двигательную активность. Повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция запускает экзоцитоз и образование отростков [20]. При этом необласты начинают двигаться к поврежденным клеткам [21].

Кривая 4 на рис. 2, описываемая нормальным распределением $\Delta I = 1,16 \exp(-\ln 2((t - 1,63)/0,41)^2)$, с максимумом около 1,6 ч, соответствует, по-видимому, процессу фагоцитоза. Действительно, на планариях морфологическими методами показано, что фрагменты погибших клеток фагоцитируются близлежащими необластами в течение 1–3 ч [13]. Некоторое различие в определении времени максимальной активности фагоцитоза легко объясняется разными температурными условиями экспериментов [8]. Давно известно, что фагоцитозная активность сопровождается существенными изменениями в проводимости плазматической мембраны для ионов калия и водорода. Фагоцитоз сопровождается сильным увеличением неселективной проводимости плазматической мембраны, приводящей к полной деполяризации [22]. Деполяризация, в свою очередь, активирует энергоемкие механизмы активного ионного транспорта, а, как уже отмечалось, повышение функциональной нагрузки приводит к резкому росту генерации АФК. Хемилюминесцентный анализ традиционно используется для исследования функциональной активности фагоцитирующих клеток. Поглощение объектов фагоцитоза коррелирует с генерацией кислородных радикалов в фагоцитирующих клетках и вызывает усиление хемилюминесценции. При фагоцитозе наблюдается образование клетками АФК, включая супероксиданион радикал, гидроксильный анион, синглетный кислород, перекись водорода, гипохлорид. Процесс фагоцитоза, в частности нейтрофилами периферической крови, занимает около 1 ч [23]. Отметим, что аутофагия широко распространена в животном мире и является эволюционно консервативным механизмом адаптации к неблагоприятным условиям микроокружения [24]. Фагоцитоз у планарий является важнейшим инструментом не только при регенерации, но и при питании. Стенки кишечника планарии после попадания пищи распадаются и содержимое кишечника попадает в паренхиму. Клетки кишечника и другие клетки паренхимы планарий (кроме нервных) фагоцитируют пищу, после чего происходит восстановление исходной структуры тела [25]. Ранее было показано, что процесс фагоцитоза, связанный с перевариванием пищи у планарий, сопровождается интенсивной хемилюминесценцией, развивающейся в течение суток и продолжающейся до пяти дней

[26]. В отличие от этих экспериментов, настоящее исследование хемилюминесценции при регенерации проводилось на голодных животных, что привело к существенному уменьшению общего уровня сверхслабого свечения по сравнению с фагоцитозом после кормления планарий мотылем [26]. Тем не менее несомненно, что в обоих случаях было зарегистрировано сверхслабое свечение, связанное с фагоцитозом.

Кривые 5 и 6 на рис. 2, описываемые нормальными распределениями $\Delta I = 1,41 \exp(-\ln 2((t - 5,11)/1,85)^2)$ и $\Delta I = 1,78 \exp(-\ln 2((t - 8,26)/3,21)^2)$, имеют максимумы через 5,1 ч и через 8,3 ч после декапитации. Можно предположить, что эти пики соответствуют митотической активности разных популяций необластов [27]. Действительно, многочисленными экспериментами показано, что первый пик пролиферации необластов отмечается через 6 ч после операции [15]. В наших экспериментах проявлялись два пика роста АФК – через 5,1 ч и через 8,3 ч. Некоторые расхождения времен максимальной митотической активности могут быть связаны, как уже указывалось выше, с разными температурными условиями экспериментов [8]. Ранее в экспериментах выявлены две рентген-чувствительные фракции необластов планарии, различающиеся по содержанию ДНК и размеру цитоплазмы. В первой фракции, содержащей клетки в $S/G_2/M$ -фазах, находились как недифференцированные необласты, так и необласты, прошедшие первичную дифференцировку. Во второй фракции, содержащей клетки в G_0/G_1 -фазах, находился особый тип стволовых клеток, отличающихся малым размером, несколькими хроматоидными тельцами и ядрами, обогащенными гетерохроматином [28]. Указанные популяции необластов могут входить в митоз со сдвигом по времени. Однако клетки, находящиеся в G_0/G_1 -фазах, могут входить в митоз только через 24 ч, а оба пика пролиферации регистрировались в наших экспериментах уже через 5–8 ч после декапитации. Другое объяснение полученных результатов связано с тем, что *Girardia tigrina* является миксоплоидным видом [30], т.е. часть клеток планарии этого вида, включая и необласты, являются диплоидными, а половина – триплоидными, т.е. содержат тройной набор хромосом. Можно предположить, что эти популяции клеток различаются временами синтеза ДНК и будут давать два пика, времена появления которых будут различаться в полтора раза. Действительно, в наших экспериментах отношение времен достижения максимумов митотической активности от момента декапитации составляло $8,26/5,11 = 1,61 \approx 1,5$.

Таким образом, нами впервые показана возможность регистрации физиологического состояния плюрипотентных стволовых клеток на уровне организма *in vivo*. Эта возможность обусловлена тем, что плюрипотентные стволовые клетки – необласты – составляют значительную часть биомассы планарии (до 30% от общего количества клеток) [14]. При этом фагоцитарная активность необластов, так же как и митоз, активируют дыхание, увеличивают потребление кислорода и, следовательно, стимулируют генерацию АФК. Двигательная активность, развиваемая планариями при отлове с помощью пипетки и помещении в сцинтилляционную кювету, и сокращение мышц, приводящее к закрытию раны в течение нескольких минут после декапитации, также стимулируют производство АФК. Выявление природы двух пиков пролиферации необластов после декапитации, а также количественная оценка необластов, участвующих в процессе регенерации, является задачей будущих исследований.

Авторы выражают искреннюю благодарность проф. В.И. Брускову за полезные замечания при обсуждении результатов работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 15-29-01135 и Госзадания Министерства образования и науки РФ, № 2912.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. В. Гудков, В. Е. Иванов, О. Э. Карп и др., Биофизика **59** (5), 862 (2014).
2. V. I. Bruskov, O. E. Karp, S. A. Garmash, et al., Free Radic. Res. **46**, 1280 (2012).
3. S. V. Gudkov, V. I. Bruskov, M. E. Astashev, et al., J. Phys. Chem. B **115** (23), 7693 (2011).
4. N. Pirotte, A. S. Stevens, S. Fraguas, et al., Oxid. Med. Cell Longev. **2015**, 392476 (2015); doi: 10.1155/2015/392476.
5. S. Vriza, S. Reiter, and B. Galliot, Curr. Top. Dev. Biol. **108**, 121 (2014); doi: 10.1016/B978-0-12-391498-9.00002-4.
6. S. A. Elliott and A. S. Alvarado, Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. **2** (1), 301 (2013); doi:10.1002/wdev.82.
7. M. L. Scimone, K. M. Kravarik, S. W. Lapan, and P. W. Reddien, Stem Cell Reports **3** (2), 339 (2014); doi: 10.1016/j.stemcr.2014.06.001.
8. X. П. Тирас, О. Н. Петрова, С. Н. Мякишева и др., Фунд. исслед. **2** (7), 1412 (2015).
9. D. W. Marquardt, J. Soc. Indust. Appl. Math. **11**, 431 (1963).
10. V. I. Bruskov, L. V. Malakhova, Z. K. Masalimov, and A. V. Chernikov, Nucl. Acids Res. **30** (6), 1354 (2002).

11. С. В. Гудков, О. Э. Карп, С. А. Гармаш и др., *Биофизика* **57** (1), 5 (2012).
12. Ю. А. Владимиров и У. В. Проскурнина, *Успехи биол. химии* **49**, 341 (2009).
13. С. Gonzblez-Estivez and E. Saly, *Apoptosis* **15** (3), 279 (2010); doi: 10.1007/s10495-009-0445-4.
14. J. Baguca, E. Saly, J. Collet, et al., *Progr. Zool.* **36**, 65 (1988).
15. M. Almuedo-Castillo, X. Crespo, F. Seebeck, et al., *PLoS Genet.* **10** (6), e1004400 (2014); doi: 10.1371/journal.pgen.1004400.
16. К. В. Aslanidi and L. Ju. Boitzova, in: *Intercellular communication, Proceedings in nonlinear science* (Manchester University Press, 1991), pp. 3–11.
17. Т. В. Potapova, К. В. Aslanidi, L. and Ju. Boitzova, *FEBS Lett.* **262** (1), 69 (1990).
18. К. В. Aslanidi, L. Ju. Boitzova, L. M. Chailakhyan, et al., *FEBS Lett.* **283** (2), 295 (1991).
19. К. Б. Асланиди, Г. В. Асланиди, Д. М. Вачадзе и др., *Биол. мембраны* **14** (1), 50 (1996).
20. А. Я. Дунина-Барковская, *Биол. мембраны* **21** (4), 245 (2004).
21. И. М. Шейман, *Регуляторы морфогенеза и их адаптивная роль* (Наука, М., 1984).
22. К. О. Holevinsky and D. J. Nelson, *Biophys. J.* **75** (5), 2577 (1998).
23. Г. Н. Федоров и С. Д. Леонов, *Электрон. мат. и мед.-биол. журн.* **6** (4) (2007); URL: <http://www.smolensk.ru/user/sgma/MMORPH/TITL.HTM>].
24. L. Galluzzi, F. Pietrocola, B. Levine, and G. Kroemer, *Cell* **159** (6), 1263 (2014); doi: 10.1016/j.cell.2014.11.006.
25. I. M. Sheimann and N. Ju. Sakharova, *Comp. Biochem. Physiol. A* **48**, 601 (1974).
26. Kh. Tiras, C. Novikov, and V. Voeykov, in: *Proc. IX Intern. Symp. of Biology of Turbellaria*, Ed. by J. Baguna (Barcelona, 2001), p. 50.
27. Х. П. Тирас и К. Б. Асланиди, в сб.: *Материалы междунар. конф. «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация»* (Пушино, 2015), т. 1, сс. 84–89.
28. S. Higuchi, T. Hayashi, I. Hori, et al., *Dev. Growth Differ.* **49** (7), 571 (2007).
29. M. Lucila Scimone, K. M. Kravarik, S. W. Lapan, and P. W. Reddien, *Stem Cell Rep.* **3** (2), 339 (2014); doi: 10.1016/j.stemcr.2014.06.001.
30. M. Ribas, M. Riutort, and J. Baguna, *J. Zool. (Lond.)* **218**, 609 (1989).
31. А. М. Ermakov, О. Н. Ermakova, А. А. Kudrvtsev, and N. D. Kreshchenko, *Mol. Biol. Rep.* **36** (1) (2009); doi 10. 1007/s11033-011-1070-1.

Own Chemiluminescence of Planarian Neoblasts during Regeneration

H.P. Tiras* **, S.V. Gudkov* ** *** ****, V.I. Emelyanenko* *****, and K.B. Aslanidi*

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

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

****Prokhorov Institute of General Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 38, Moscow, 119991 Russia*

*****National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

******Institute of Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 7, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

We investigated the kinetics of the luminescence induced by reactive oxygen species in planarians during regeneration process. It was found that regeneration is accompanied with changes in the concentration of reactive oxygen species correlating with energy-intensive processes such as oxidative stress, caused by damage to cell membranes in the dissection of the planarian, phagocytosis of dying cells and mitosis of neoblasts. We showed for the first time that there is an opportunity of registering the physiological state of pluripotent stem cells at the level of the organism *in vivo*.

Key words: reactive oxygen species, chemiluminescence, planarian, regeneration, neoblasts, apoptosis, phagocytosis, mitosis