

Министерство образования и науки РФ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ЗООЛОГИИ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ГИСТОЛОГИИ

Специальность: 020203 – зоология

Специализация: зоология беспозвоночных


ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**ВОЗДЕЙСТВИЕ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЛАНАРИЙ *SCHMIDTEA*  
*MEDITERRANEA* И *DUGESIA TIGRINA* (PLATHELMINTHES, TRICLADIDA)  
БИОСОВМЕСТИМЫХ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ**

**Работа завершена:**

« 26 » мая 2014 г.

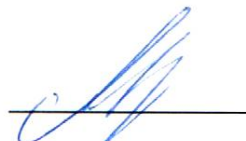
 (Т. А. Кузнецова)

**Работа допущена к защите:**

Научный руководитель

Кандидат биологических наук, ассистент

« 26 » мая 2014 г.

 (А. Г. Порфирьев)

Заведующий кафедрой

Кандидат биологических наук, доцент

« 26 » мая 2014 г.

 (Р. М. Сабилов)

Казань – 2014

## РЕФЕРАТ

**Ключевые слова:** РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЛАНАРИЙ, МЕТОД ПРИЖИЗНЕННОЙ МОРФОМЕТРИИ, НЕОБЛАСТЫ.

Исследовано воздействие биосовместимых магнитных наночастиц серебра (Ag) на регенерацию планарий двух видов *Schmidtea mediterranea* (трисомики) и *Dugesia tigrina* методом прижизненной морфометрии. Параллельно изучены необласты планарий – клетки ответственные за регенерацию, а также был проведен гистологический анализ бластемы регенерирующих триклад.

Обнаружено, что магнитные наночастицы имеют разное воздействие на регенерацию планарии *Schmidtea mediterranea*, выступая при одних концентрациях, как ингибиторы процесса регенерации бластемы, а при более низких концентрациях играя роль активаторов пролиферации.

Установлено, что выбранные концентрации магнитных наночастиц в эксперименте с видом *D. tigrina* не оказывают значительного воздействия на модельный объект, а более высокие концентрации оказываются летальными.

Выделены необласты планарий вида *Dugesia tigrina* на разных стадиях клеточного цикла: типичный необласт в покоем состоянии; необласт на стадии деления клеточного ядра; формирующий клетки паренхимы; формирующий эпителиальную ткань.

Выпускная квалификационная работа изложена на 53 страницах, содержит 16 рисунков, 7 таблиц, список литературы 62 источника.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
1 Обзор литературы.....	8
Экспериментальная часть.....	14
2 Материалы и методы.....	14
2.1. Условия содержания планарий.....	14
2.1.1. Содержание культуры планарий.....	14
2.1.2. Кормление планарий.....	14
2.2. Принципы и этапы проведения эксперимента.....	15
2.2.1. Принцип метода прижизненной компьютерной морфометрии.....	15
2.2.2. Концентрации.....	17
2.2.3. Характеристика раствора наночастиц.....	18
2.2.4. Операция декапитации планарий.....	18
2.2.5. Регистрация отрастания бластемы методом компьютерной морфометрии.....	19
2.2.6. Анализ электронных изображений регенерирующих планарий.....	19
2.2.7. Определение критерия регенерации и величины эффекта действия препарата.....	20
2.2.8. Статистическая обработка результатов эксперимента.....	21
2.3. Методика приготовления гистологических препаратов.....	21
2.4. Выделение необластов планарий.....	23
2.5. Систематическое положение планарий.....	25
3 Результаты и обсуждения.....	26

3.1. Пролиферация у планарий вида <i>Schmidtea mediterranea</i> .....	26
3.2. Гистологические анализ бластемы планарии вида <i>Schmidtea mediterranea</i> .....	30
3.3. Пролиферация у планарий вида <i>Dugesia tigrina</i> .....	32
3.4. Выделение необластов планарий.....	38
Выводы.....	41
Список использованных источников.....	42
Приложение.....	48

## ВВЕДЕНИЕ

Планарии (*Tricladida*)— отряд плоских червей, относящийся к классу ресничных червей (*Turbellaria*). Планарии характеризуются очень высокой регенерационной способностью и довольно простой организацией (Дыганова с соавт., 1990; Иванов с соавт., 1973, 1981; Порфирьева с соавт., 1987). В настоящее время они являются широко используемой тест-системой, позволяющей изучать регенерационные явления не только на уровне феноменов, но и на клеточном уровне. Регенерирующие планарии являются удобной моделью для изучения биологического действия различных веществ и экологических факторов.

В последние годы увеличилось количество работ посвященных изучению воздействия магнитных наночастиц на различные биологические объекты (далее по тексту – магнитные частицы) (Amiard et al., 2006; Brunner et al., 2006; Chithrani et al., 2007; Gupta et al., 2004; Hamilton et al., 2009; Harush-Frenkel et al., 2007; Javier García-Alonso et al., 2011; Ma, 2008; Moore et al., 2006; Minullina et al., 2011; Navarro et al., 2008; NeenuSingha et al., 2010; Pankhurst et al., 2003; Ringwood et al., 2010; Thomas et al., 2007; Wang et al., 1999; Wilhelm et al., 2003, 2002; Zhang et al., 2002). В практическом плане подобные работы позволяют исследовать очень широкий спектр проблем, таких как: структурированность функциональной поверхности живых клеток, изучение клеточного обмена, а также помочь при изготовлении цельноклеточных биосенсоров. Современные исследования свидетельствуют о широких перспективах практического использования магнитных наноматериалов благодаря появлению у вещества в наноразмерном состоянии уникальных свойств, которых не было ранее и которые невозможно предсказать, исходя из строения и свойств исходного вещества (Першина с соавт., 2008). В настоящее время на основе наночастиц разрабатывают высокоспецифичные диагностические системы и эффективные методы терапии, в частности, для

целевой доставки препаратов и управляемой локальной гипертермии раковых опухолей (Поляков с соавт., 2010). Наночастицы, обладающие магнитными свойствами, представляют значительный интерес для медицины, что связано с возможностью дистантного управления ими и конструкциями на их основе при наложении внешнего магнитного поля (Першина с соавт., 2008). Осаждение магнитных наночастиц на живые клетки, учитывая разнообразие живых организмов, предлагает неограниченный диапазон потенциальных применений. В связи со всем вышеперечисленным, необходимо сделать вывод, что исследование воздействия магнитных наночастиц на живые организмы является актуальной проблемой.

В настоящей работе нами было проведено изучение пролиферативной активности магнитных наночастиц серебра (Ag) на регенерацию двух модельных объектов – планарий вида *Schmidtea mediterranea* и *Dugesia tigrina* (Plathelminthes, Tricladida). Параллельно с этим нами были изучены необласты планарий – клетки ответственные за регенерацию, а также был проведен гистологический анализ бластемы регенерирующих триклад. Выбор объектов исследования связан с тем, что подобные работы ранее не проводились. Лабораторная культура планарий *S. mediterranea* и *D. tigrina* является в высокой степени популярным модельным объектом в различных биологических исследованиях всевозможных направлений. Использование триклад *S. mediterranea* и *D. tigrina* обусловлено относительной простотой их культивирования и содержания.

В связи со всем вышеперечисленным, **целью** данной работы является исследование воздействия биосовместимых магнитных частиц на регенерацию планарии *S. mediterranea* и *D. tigrina*. Для достижения этой цели решались следующие **задачи**:

- Проанализировать литературные источники по вопросу регенерации у планарий.

- Осуществить культивирование лабораторных планарий *S. mediterranea* и *D. tigrina*.
- Провести экспериментальную часть методом прижизненной морфометрии.
- Определить концентрации магнитных наночастиц, влияющих на пролиферацию планарий.
- Выделить и провести анализ необластов планарий *S. mediterranea* и *D. tigrina*.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Работы по изучению регенерации у планарии ведутся на протяжении более ста лет. Многие известные ученые, в том числе Томас Хант Морган (Morgan, 1898), исследовали механизмы, лежащие в основе процесса регенерации, который до сих пор остается еще до конца не понятым явлением.

В представлении, ставшим уже классическим, необласты - это тотипотентные стволовые клетки, которые являются основным компонентом, из которого формируется регенерирующая почка или бластема. Дискуссия о «тотипотентности» необластов до сих пор является актуальной (Bosh, 2008); [National Institutes of Health, 2001]. «Тотипотентные» клетки могут дать начало всем типам клеток, включая зародышевые клетки. Клетки, которые не обладают возможностью дифференцироваться в зародышевые клетки, но могут дифференцироваться в любой тип соматических клеток, называются «плюрипотентными» клетками.

Другой проблемой терминологии является использование термина "необласты". Недавние исследования, использующие методы молекулярной маркировки, а также методы проточной цитометрии, показали неоднородность популяции необластов (Sato et al., 2006; Higuchi et al., 2007). Таким образом, можно констатировать, что проблема в классификации необластов является актуальной и до конца не разрешенной.

Необласты впервые были описаны Рэндольфом (1897) и повторно Дюбуа (1949). Рэндольф описывал, что это веретенообразные базофильные клетки, могут наблюдаться во время регенерации, мигрируя к ране и участвуя в строительстве регенерирующей бластемы. Дюбуа обнаружил, что эти клетки чувствительны к рентгеновскому облучению, и теряют способность к регенерации после него. В конце 19-го века Томас Хант Морган показал, что кусочек планарии, соответствующий  $1/279$  ее тела может успешно восстановить



все тело планарии (Morgan, 1898). Этот вывод убедил ученых, что «плюрипотентные» стволовые клетки присутствуют во всем теле планарии.

Педерсен (1959) исследовал необласты при помощи электронного микроскопа (EM). Морфологически необласты имеют много признаков, по которым их можно объединить с недифференцированными клеткам других организмов - это небольшое количество цитоплазмы и большое ядро со значительным количеством деконденсированной ДНК. Ветцель (1961) описывал необласты, которые находились в покое и не мигрировали к ране, т.е. не участвовали в процессе дифференциации в бластеме. Он описал их как клетки округлой формы с яйцевидным ядром.

Необласты обладают одной примечательной особенностью - наличием электронно-плотной мембраны и хроматоидных тел в их цитоплазме (Hori, 1982; Auladell et al., 1993). Хроматоидные тела начинают уменьшаться в размере в течение дифференцировки всех регенерирующих клеток, тем не менее, полностью они не исчезают в процессе регенерации (Hori, 1982; 1997).

Классические исследования Вольфа и Дюбуа продемонстрировали роль необластов в процессе регенерации (Wolff, Dubois, 1948). Их исследование показало, что планарии теряют способность к регенерации после рентгеновского облучения. Было выявлено, что необласты особенно чувствительны к облучению: после утраты необластов планария теряет способность к регенерации.

В 1980 году было опубликовано несколько работ по трансплантации необластов (Вагуйна et al., 1989). В исследованиях были осуществлены попытки концентрации необластов и последующий перенос их в тело планарии после рентгеновского облучения. В процессе исследования пересаживали смесь, состоящую из разнородных клеточных популяций. По завершению экспериментов было сделано заключение, что необласты являются "тотипотентными" стволовыми клетками, также был сделан вывод, что

миграция необластов – это не активная миграция в сторону бластемы, а распространение клеток за счет пролиферации.

Многие исследователи пытались выделить культуру клеток из необластов планарий, но никому не удалось индуцировать их пролиферацию «in vitro» (Teshirogi, Ishida, 1987). Одной из причин этого является то, что фрагментированные клетки выделяют много протеаз и токсичных материалов, убивая при этом необласты.

Фактически историю изучения необластов можно разделить на несколько основных этапов. В период 1890-1940-х годов необласты определялись как недифференцированные блуждающие клетки неясного происхождения с основной, хотя и неопределенной, роли в регенерации. В 1940-1960-х годах учёные пришли к выводу, что необласты – недифференцированные клетки, находящиеся в состоянии покоя, чья основная функция заключается в создании бластемы во время процесса регенерации. В 60-80-х годах XX века была сформулирована клеточная теория дедифференцировки, в которой необласты определяли как временные, недифференцированные клетки, возникающие при дедифференцировке дифференцированных клеток. Начиная с конца 1970-х годов необласты определяются как «основные ячейки для регенерации» и играют важную роль в качестве соматических стволовых клеток для ежедневного износа тканей, а также в качестве источника половых клеток. На современном этапе были проведены исследования, где с помощью инъекции одиночных необластов у летально облученных планарий возобновляли митотическую активность бластемы и достигали полного выживания объектов исследования (Baguna et al., 1989; Baguna, 2012). Исследование необластов планарий вида *Dugesia tigrina* показало, что бластема планарий формируется путем местной миграции ранних накоплений недифференцированных клеток. Полученные результаты доказали, что формирование бластемы планарий происходит через механизмы, отличающиеся от механизмов образования классических эпиморфных моделей регенерации (Annelida, Insecta, Amfibia).

Исследователи предположили, что регенерация планарий возможно представляет собой промежуточную ступень между морфолактической и эпиморфной регенерациями (Baguna, Salo, 1984).

Известно, что не все виды планарий способны к регенерации, не регенерируют, например, молочно-белая планария и некоторые байкальские эндемики (Шейман с соавт., 2010). Кроме того, не всегда регенерация сопровождается образованием бластемы (Nentvig, 1978). Значительный пласт работ посвященных изучению регенерации планарии опирается на факты восстановления различных фрагментов планарий, их глотки, глаз и кожно-мышечного мешка (Sengel, 1959; Wolff, 1962; Ziller, 1973).

Опыт использования планарий в качестве модельных объектов по изучению воздействия на степень регенерации также насчитывает не один десяток лет. Ранние работы по изучению пролиферации в фармакологическом скрининге базировались на фиксации факта появления глаз у регенерирующих планарий (Lenicque, Tcharajeva, 1969).

Метод прижизненной морфометрии, который используется в нашем исследовании, был разработан и впервые применен в работе Х.П. Тираса и Н.Ю. Сахаровой (1984), в которой морфологические параметры сфотографированных планарий измеряли с помощью линейки. В дальнейшем метод был усовершенствован в связи с появлением нового программного обеспечения и оборудования (Тирас, Хачко, 1990; Шейман с соавт., 2004). Этот метод является высокочувствительным, выявляющим соответствующее свойство тестируемого вещества на уровне целостного организма, и обеспечивает высокую надежность получаемых результатов.

Метод также может быть применен при скрининге лекарственных препаратов – потенциальных регуляторов (стимуляторов и ингибиторов) пролиферации. Кроме того, он позволяет оценить возможное токсическое действие нового фармакологического вещества на процессы морфогенеза.

На настоящий момент значительный интерес в данной области представляют работы, посвященные влиянию электромагнитного экранирования различной продолжительности на регенерацию планарий. В ходе одной из таких работ было исследовано влияние электромагнитного экранирования на процессы регенерации планарий. Показано, что кратковременное периодическое электромагнитное экранирование (один час в сутки) приводит к увеличению скорости регенерации на 13%, а длительное электромагнитное экранирование (23 часа в сутки) регенерирующих планарий в течение десяти дней увеличивает скорость их регенерации на 147%. (Демцун, 2008).

Исследование по изучению процесса пролиферации планарий вида *Dugesia tigrina*, на которых в ходе эксперимента воздействуют слабые комбинативные магнитные поля (КМП) проведено А. М. Ермаковым (Ермаков, 2010). В данной работе экспериментально доказана возможность модуляции регенерации планарий *Dugesia tigrina* и развития жуков *Tenebrio molitor* с помощью слабых комбинированных магнитных полей (КМП) в режиме магнитного параметрического резонанса, а также КМП с крайне слабой амплитудой переменной компоненты. Полученные результаты показывают возможность создания принципиально нового поколения магнитотерапевтической аппаратуры для лечения ряда широко распространенных социально-значимых болезней, а также имеют важное значение, как для планирования, так и для оценки эпидемиологических исследований (Ермаков, 2010).

В недавнее время были проведены работы по изучению влияния ртутьорганических соединений природного происхождения на регенерацию планарий *Dugesia tigrina*. Результаты этих исследований доказывают способность накопления высоких концентраций ртути в организме планарий, что, как выяснилось, не мешает их половому размножению. При нанесении значительных травм восстановительные процессы у планарий *D. tigrina* подавляются, и наблюдается гибель некоторых контрольных и большинства

опытных животных. Интенсивность заживления дополнительных надрезов зависит от величины повреждаемого фрагмента тела планарий и от локализации надреза (Медведев, Комов, 2005).

В настоящий момент работы по изучению регенерации планарий перешли на новый этап исследований, что связано с применением метода проточной цитометрии. В исследовании Ермакова (Ermakov et al., 2012) качественные и количественные характеристики необластов были изучены с помощью данного метода. Количественная оценка клеточного цикла, связанная с изменениями системы стволовых клеток планарии, была проведена в различных физиологических условиях (неповрежденные и регенерирующие животные) и под влиянием физических (ионизирующего излучения) и химических (мелатонина и колхицин) факторов. В результате анализа стволовых клеток, метод проточной цитометрии оказался эффективным, а значит, может быть рекомендован к дальнейшему применению.

## ВЫВОДЫ

1.) Осуществлено культивирование и разведение бесполой лабораторной культуры планарий вида *Schmidtea mediterranea* и *Dugesia tigrina*.

2.) Биосовместимые магнитные наночастицы серебра имеют разное воздействие на регенерацию планарии *Schmidtea mediterranea*, при концентрации 1мг/500 мкл они выступают в качестве активаторов пролиферации, доза в 3мг/500 мкл ингибирует процесс регенерации бластемы. Концентрация в 5мг/500 мкл является летальной для данного вида. Бластема планарий *Schmidtea mediterranea* на тканевом уровне характеризуется отсутствием оформленных границ покровного ресничного эпителия и хорошо выраженной базальной мембраны.

3.) Для вида *Dugesia tigrina* выбранные концентрации магнитных наночастиц серебра не оказывают значительного воздействия на пролиферацию в сравнение с контрольной группой, а более высокие концентрации магнитных наночастиц вызывают летальный исход у планарий.

4.) Выделены и описаны морфологические особенности необластов *Dugesia tigrina* на разных стадиях клеточного цикла. необласт не участвующий в формировании регенерационной почки - бластемы; на стадии деления клеточного ядра; формирования клеток паренхимы, формирования эпителиальной ткани. Большая часть необластов выделена из бластемы планарий; на постбластемном участке необласты отмечаются значительно реже.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1) Демцун Н.А., Тимурьянц Н.А., Мартынюк В.С. Особенности регенерации планарии *Dugesia tigrina* при их электромагнитном экранировании в различные сезоны года // Физика живого, Т. 16, No2, 2008. - С. 85 - 91.
- 2) Дыганова Р.Я., Порфирьева Н.А. Планарии Азиатской части СССР: Морфология, систематика, распространение. // Казань: Изд-во Казанского университета, 1990. – 150 с.
- 3) Ермаков М.А. Влияние слабых комбинированных магнитных полей на регенерацию планарий *Girardia tigrina* и метаморфоз жуков *Tenebrio molitor*. // Авторская диссертационная работа, Пущино, 2010.
- 4) Иванов А.В., Мамкаев Ю.В. Ресничные черви (*Turbellaria*), их происхождение и эволюция (Филогенетические очерки). // Л., «Наука», 1973.– С. 1 – 221.
- 5) Иванов А.В., Полянский Ю.И., Стрелков А.А. Большой практикум о зоологии беспозвоночных (Простейшие, губки, кишечноротовые, гребневники, плоские черви, немуртины, круглые черви). // М.: Высшая школа, 1981. – 504 с.
- 6) Медведев И.В., Комов В.Т. Воздействие ртуторганических соединений природного происхождения на регенерацию у двух видов пресноводных планарий *Dugesia tigrina* и *Polycelis tenuis* // Онтогенез. 2005. Т. 36. № 1. - С. 35–40.
- 7) Наумова Т.В. Морфология, систематика и филогения рода *Bdellocephala* De Man, 1875 (*Plathelminthes, Turbellaria, Tricladida: Paludicola*) // Владивосток, 2003. – 22 с.
- 8) Першина А.Г., Сазонов А.Э., Мильто И.В. Использование магнитных наночастиц в биомедицине // Бюллетень сибирской медицины, № 2, 2008. – С. 70 – 78.

9) Поляков А.Ю., Гольдт А.Е., Соркина Т.А., Давыдова Г.А., Гудилин Е.А., Перминова И.В. Синтез биосовместимых магнитных наночастиц с различной морфологией и их стабилизация гуминовыми кислотами // Перспективные материалы, 2010. – С. 204 – 210.

10) Порфирьева Н.А., Дыганова Р.Я. Планарии Европейской части СССР. Мофрология, систематика, распространение. – Казань: Издательство Казанского университета, 1987. – 189 с.

11) Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Иностранная литература. 1953. – 718 с.

12) Тирас Х. П., Сахарова Н.Ю. Прижизненная морфометрия регенерации планарий // там же. 1984. Т. 15. №1. С. 41-48.

13) Тирас Х.П, Хачко В. И. Критерии и стадии регенерации у планарий // Онтогенез. — 1990. — Т 21. — С. 620—624.

14) Чернышева А.О. Особенности строения кожно-мышечного мешка триклад (*Turbellaria, Tricladida*) // Vestnik zoologii, 36 (2), 2002. – С. 47 – 56.

15) Шейман И.М., Седельников З.В., Крещенко Н.Д. и др. Морфогенез у планарий *Dugesia tigrina* // Там же. 2004. Т. 35. № 4. С. 285–291.

16) Шейман И. М., Крещенко Н. Д., Нетреба М. В. и др. Процесс регенерации у планарий разных видов // Онтогенез. - 2010. - Т. 41, N 2. - С.114-119.

17) Alejandro Sa´nchez Alvarado, Hara Kang. Multicellularity, stem cells, and the neoblasts of the planarian *Schmidtea mediterranea*. Experimental Cell Research, 2005, 306: 299 – 308 p.

18) Amiard, J.-C.; Amiard-Triquet, C.; Barka, S.; Pellerin, J.; Rainbow, P. S Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquat. Toxicol. 2006, 76, 160–202 p.

19) Artem M. Ermakov, Olga N. Ermakova, Andrei A. Kudravytsev, Natalia D. Kreshchenko. Study of planarian stem cell proliferation by means of flow cytometry. Mol Biol Rep, 2012, 39:3073–3080p.



- 20) Auladell, C., Garcia-Valero, J., Bagunà, J. Ultrastructural localization of RNA in the chromatoid bodies of undifferentiated cells (neoblasts) in planarians by the RNase-gold complex technique. *J. Morphol.* 216: 1993. 319–326 p.
- 21) Baguna J. Planarian neoblasts. *Nature.* 1981. 290(5):14–15p.
- 22) Baguna J. The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes. *Int. J. Dev. Biol.*, 2012, 56: 19-37p.
- 23) Baguna J., Romero R., Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. *Hydrobiologia*, 1981, 84: 181–194p.
- 24) Baguna J., Salo E. Regeneration and pattern formation in planarians I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia (G) tigrina*, and a new proposal for blastema formation. *J. Embryol. exp. Morph.*, 1984,83, 63-80 p.
- 25) Baguna J., Salo E., Auladell C. Regeneration and pattern formation in planarians III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development*, 1989, 107: 77-86p.
- 26) Bosch Thomas C. G. *Stem Cells: From Hydra to Man.* Springer, 2008. - P. 204.
- 27) Brunner, T. J.; Wick, P.; Manser, P.; Spohn, P.; Grass, R. N.; Limbach, L. K.; Bruinink, A.; Stark, W. J. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica and the effect of particle solubility. *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 4374 – 4381p.
- 28) Chithrani, B. D.; Chan, C. W. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* 2007, 7, 1542 – 1550p.
- 29) Dubois, F. Contribution a l'étude de la regeneration chez planaires dulcicoles. *Bull. Biol.* 83: 1949. 213–218 p.

30) Gupta AK, Curtis AS. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture. *J Mater Sci Mater Med* 2004; 15 (4):493–6 p.

31) Hamilton, R. F., Jr.; Wu, N.; Porter, D.; Buford, M.; Wolfarth, M.; Holian, A. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Part. Fibre Toxicol.* 2009, 6, 35 p.

32) Harush-Frenkel, O.; Debotton, N.; Benita, S.; Altschuler, Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 353, 26–32 p.

33) Higuchi, S., Hayashi, T., Hori, I., Shibata, N., Sakamoto, H., Agata, K. Characterization and categorization of fluorescence activated cell sorted planarian stem cells by ultrastructural analysis. *Dev. Growth Differ.* 49: 2007. 571–81 p.

34) Hori, I. An ultrastructural study of the chromatoid body in planarian regenerative cells. *J. Electron Microsc.* 31: 1982.63–72 p.

35) Hori, I. Cytological approach to morphogenesis in the planarian blastema. II. The effect of neuropeptides. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 29: 1997. 91–97 p.

36) Javier García-Alonso, Farhan R. Khan, Superb K. Misra, Mark Turmaine, Brian D. Smith, Philip S. Rainbow, Samuel N. Luoma, Eugenia Valsami-Jones. Cellular Internalization of Silver Nanoparticles in Gut Epithelia of the Estuarine Polychaete *Nereis diversicolor*. *Environmental Science & Technology.* – 2011. – 7 p.

37) Lenicque P, Tchapaeva L. Action of substances modifying adrenergic transmission on regeneration and scissiparity of the planarian *Dugesia tigrina*. *Therapie.* 1969; 24(6) :1043-58 p.

38) Ma P. X. Biomimetic Materials for Tissue Engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008. V. 60. P. 184–198 p.

39) Moore, M. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ. Int.* 2006, 32, 967–976 p.

- 40) Morgan T. N. Regeneration. L.: MacMillan. Co., 1901. 293 p.
- 41) National Institutes of Health. Stem Cells: Scientific Progress and Future Directions. 2001. Retrieved 08–05–2004 from <http://stemcells.nih.gov/info/basics/>
- 42) Navarro, E.; Piccapietra, F.; Wagner, B.; Marconi, F.; Kaegi, R.; Odzak, N.; Sigg, L.; Behra, R. Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. Environ. Sci. Technol. 2008, 42, 8959–964 p.
- 43) NeenuSingha, Gareth J.S. Jenkinsa, RomisaAsadib, Shareen H. Doaka. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). Coaction publishing. – 2010. – 15 p.
- 44) Nentvig M.E. Comparative morphological studies of head development after decapitation and after fission in the planarian *Dugesia dorochocephala*. Trans. Am. Microsc. Soc. 1978,50, 553–561p.
- 45) Otto FJ, Schumann J, Zante J (1990) High-resolution DNA flow cytometry in malignant melanoma. Cytom suppl 4: 55p.
- 46) Randolph, H. Observations and experiments on regeneration in planarians. Arch. Entw. Mech. Org. 5: 1897. 352–372 p.
- 47) Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. J Phys D Appl Phys 2003; 36(13):R167–81p.
- 48) Pederson K.J. Cytological studies on the planarian neoblast. Z. Zellforsch. 50: 1959. 799–817 p.
- 49) Renata T. Minullina, Yuri N. Osin, Dilara G. Ishmuchametova, Rawil F. Fakhrullin. Interfacing Multicellular Organisms with Polyelectrolyte Shellsand Nanoparticles: A *Caenorhabditis elegans* Study. Langmuir. – 2011. – 6 p.
- 50) Ringwood, A. H.; McCarthy, M.; Bates, T. C.; Carroll, D. L. The effects of silver nanoparticles on oyster embryos // Mar. Environ. Res. 2010, 69, S 49 – 51 p.
- 51) Sato, K., Shibata, N., Orii, H., Amikura, R., Sakurai, T., Agata, K., Kobayashi, S., Watanabe, K. Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of nanos-related gene in planarians. Dev. Growth Differ. 48: 2006. 615–628 p.

- 52) Sengel C. La region caudale d'une planaire est-elle capable d'indure la regeneration d'un pharynx. J. Embriol. Exp. Morphol. 1959. V. 7. №. 1. P. 73-85p.
- 53) Teshirogi, W., Ishida, S. (Eds.) Biology of Planarians—Foundation, Application & Experiment. Kyoritsu syuppan, Tokyo, 1987.
- 54) Thomas R. Pisanic, Jennifer D. Blackwell, Veronica I. Shubayev, Rita R. Finones, Sungho Jin. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. Biomaterials. – 2007. – 10 p.
- 55) Wang, W.-X.; Stupanoff, I.; Fisher, N. S. Bioavailability of dissolved and sediment-bound metals to a marine deposit-feeding polychaete. Mar. Ecol.: Prog. Ser. 1999, 178, 281–293 p.
- 56) Wetzel, B.K. Studies on the fine structure of regenerating *Dugesia tigrina*. Diss. Harvard Univ. Cambridge, Massachusetts. 1961.
- 57) Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri JC, Gazeau F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. Biomaterials 2003; 24(6) : 1001–11 p.
- 58) Wilhelm C, Gazeau F, Roger J, Pons JN, Bacri JC. Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization. Langmuir 2002;18 (21):8148–55 p.
- 59) Wolff, E., Dubois, F. Sur la migration des cellules de régénération chez les planaires. Rev. Suisse. Zool. 55: 1948. 218–227.
- 60) Wolff E. Recent researches on the regeneration of planaria. Regeneration. N.Y.: Ronald Press, 1962. P. 53-84 p.
- 61) Zhang Y, Kohler N, Zhang M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. Biomaterials 2002; 23(7):1553–61p.
- 62) Ziller C. La regeneration du pharynx chez la planaire *Dugesia tigrina*. C. R. Acad. Sci. Paris. D. 1973. V. 277. P. 1363-1368 p.