ВЛИЯНИЕ СЕРОТОНИНА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ У ПЛАНАРИЙ

Крещенко Н. Д.¹, Гребенщикова Е. В.¹, Карпов А. Н.¹

Аннотация

В работе приводятся данные по изучению влияния биогенного амина, серотонина, на морфогенетические процессы у планарий *Schmidtea mediterranea* и *Girardia tigrina* (*Turbellaria*, *Platyhelminthes*). Для исследования использовали отсеченные срединные и хвостовые фрагменты тела планарий, у которых наблюдали за регенерацией глаз. Восстановление фоторецепторов происходило с 3-го по 6-й дни регенерации. У подопытных особей, находившихся под воздействием серотонина в концентрации 0.1–1 мМ, наблюдали ускорение процесса регенерации фоторецепторов. Стимулирующий эффект проявлялся на 4–5 дни после операции.

Ключевые слова: серотонин, планарии, регенерация, морфогенез, фоторецепторы.

INFLUENCE OF SEROTONIN ON PLANARIAN PHOTORECEPTORS' REGENERATION

Kreshchenko N. D.¹, Grebenshchikova E. V.¹, Karpov A. N.¹

Abstract

The paper presents data on the effect of biogenic amine, serotonin, on morphogenetic processes in planarians *Schmidtea mediterranea* and *Girardia tigrina* (*Turbellaria*, *Platyhelminthes*). For the study, cut-off median and tail fragments of the planarian body were used, in which eye regeneration was observed. Photoreceptor recovery occurred from the 3rd to the 6th day of regeneration. In experimental specimens exposed to serotonin at a concentration of 0.1–1 μM, acceleration of

¹ Институт биофизики клетки ФИЦ ФГБУН ПНЦБИ РАН (142290, Пушкино, Московская область, ул. Институтская 3), nkreshch@rambler.ru

¹ Institute of Cell Biophysics Russian Academy of Sciences (Pushchino, Moscow Region, Institutskaya str., 3), nkreshch@rambler.ru

the photoreceptor regeneration process was observed. The stimulating effect was observed at 4–5 days after surgery.

Planaria (*Turbellaria*, *Platyhelminthes*) are free-living flatworms related to parasitic trematodes, cestodes and monogenes. In addition to the nervous, muscular, digestive, excretory and reproductive systems, they have a pair of simple eyes (photoreceptors), so they can distinguish the intensity and direction of the light flux and are oriented in space [1].

Planarium eyes are located on the dorsal surface of the head part of the body and consist of photoreceptor and pigment cells that form an "eye cup". Planaria can regenerate the whole organism from a small fragment. In the process of regeneration, the planarium can completely restore the head ganglion (brain), as well as other organs, including the eyes.

Our task was to study the dynamics of photoreceptor differentiation in planarians *Schmidtea mediterranea*, and to investigate the possible morphogenetic function of serotonin in *S. mediterranea* and *G. tigrina*.

Keywords: serotonin, planarian, regeneration, morphogenesis, photoreceptors.

Введение. Планарии (*Turbellaria*, *Platyhelminthes*) – свободноживущие плоские черви, родственные паразитическим трематодам, цестодам и моногенгеям. Наряду с нервной, мышечной, пищеварительной, выделительной и репродуктивной системами, они обладают парой простых глаз (фоторецепторов), с помощью которых различают интенсивность и направление светового потока и ориентируются в пространстве [1]. Глаза планарий расположены на дорзальной поверхности головной части тела и состоят из фоторецепторных и пигментных клеток, образующих «глазной бокал» (рис. 1а, б). Планарии могут регенерировать целый организм из небольшого фрагмента. В процессе регенерации у планарий может полностью восстанавливаться головной ганглий (мозг), а также другие органы, в том числе и глаза. О процессе регенерации фоторецепторов известно мало. Так, было установлено, что у планарий *G. tigrina* регенерация глаз происходит с 3-го по 6-й дни после отсечения срединных фрагментов. Разработаны количественные критерии восстановления морфологической структуры глаз в ходе их регенерации и выделено четыре стадии дифференцировки фоторецепторов [2]. Также был разработан метод анализа функциональной активности фоторецепторов планарий [3]. Перед нами стояла задача изучить динамику дифференцировки фоторецепторов у планарий *Schmidtea mediterranea* (рис. 1а), и исследовать возможную морфогенетическую функцию серотонина у *S. mediterranea* и *G. tigrina*.

Материалы и методы. Животных (рис. 1а) содержали в затемненных аквариумах, кормили 2 раза в неделю и перед экспериментом выдерживали голодными в течение 7 дней. В ходе операции отсекали срединный и хвостовой фрагменты тела (1/3 части тела, рис. 1в). Прооперированных особей помещали в стеклянные стаканчики с водой (контрольная группа) или свежеприготовленным раствором серотонина (подопытная группа) при $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Начиная с 3-х суток после операции, животных просматривали под бинокулярным микроскопом, оценивая степень дифференцированности фоторецепторов. Визуальные наблюдения подтверждали с помощью гистологического анализа тотальных препаратов.

Рис. 1а. Планария *Schmidtea mediterranea*.
Парные фоторецепторы на
головном конце тела,
масштаб 1мм

Рис. 1б. Пигментные клетки
(темным) в составе глазного
бокала, замороженные
срезы, световая микроско-
пия, масштаб 50 мкм

Рис. 1в. Схема опе-
раций при изучении
регенерации глаз
в срединных и хвосто-
вых фрагментах

Результаты исследований. При проведении опытов впервые у планарий *S. mediterranea* наблюдали за динамикой дифференцировки фоторецепторов в хвостовых и срединных фрагментах тела (табл. 1). Регенерация фоторецепторов у *S. mediterranea* проходила с 3-го по 6-й дни после операции. За это время структура фоторецепторов претерпевала несколько стадий развития (или дифференцировки). Сначала мог появляться один глаз, а затем второй; в случае, если появлялись два глаза — один из них, мог быть развит слабее, или оба они были слабо развиты.

Со временем происходило усиление степени дифференцированности фоторецепторов за счет добавления пигментных и светочувствительных клеток. Максимальное число особей *S. mediterranea* с дифференцированными фоторецепторами наблюдали на 4–5 дни регенерации,

при этом с каждым днем увеличивалось число более развитых глаз (табл. 1). В каждой группе планарий число особей с разной степенью дифференцированности фоторецепторов варьировало, вероятно, в зависимости от размера и качества отсеченного фрагмента (хвостовой или срединный), и индивидуальной регенерационной способности. При сравнении динамики регенерации глаз у *S. mediterranea* с другим видом *G. tigrina* [2] обнаружено, что сроки регенерации глаз у двух видов планарий совпадают. Таким образом, процесс регенерации глаз у планарий поддается количественному анализу и может использоваться в качестве морфогенетической модели для тестирования биологически активных соединений, оказывающих направленное влияние на процессы регенерации и развития.

Таблица 1

Стадии дифференцировки глаз у планарий *Schmidtea mediterranea* (хвостовые и срединные фрагменты тела), количество особей и их процент от общего числа животных для каждой стадии регенерации

Группа, дата постановки опыта, день регенерации	Стадии дифференцировки глаз				Число особей
	Два глаза выражены хорошо	Два глаза, один выражен слабее	Один глаз	Без глаз	
Хвостовые фрагменты 05/04/13 – 4-й день	8–16.0%	11–22.0%	5–10.0%	26–52.0%	n=50
Хвостовые фрагменты 12/04/13 – 4-й день	29–61.7%	13–27.7%	1–2.1%	4–8.5%	n=47
Хвостовые фрагменты 22/05/12 – 5-й день 23/05/12 – 6-й день	29–55.7% 38–73.1%	6–11.3% 10–19.2%	5–9.4% 0–0.0%	13–24.6% 4–7.7%	n=53 n=52
Срединные фрагменты 21/05/12 – 4-й день 22/05/12 – 5-й день	22–34.9% 41–67.2%	4–6.4% 12–19.7%	7–11.1% 3–4.3%	30–47.6% 5–8.2%	n=63 n=61

Изучение влияния серотонина на регенерацию показало, что он может ускорять дифференцировку фоторецепторов: так, в подопытных группах планарий, суммарное число особей с двумя глазами на 5-й день регенерации составило 65–68%, в то время как, в контрольной-1 группе только 51% (табл. 2, II столбик). Во втором опыте, хотя общее число двуглазых планарий было практически одинаковым, наблюдали большее число особей с более продвинутой стадией дифференцировки (I столбик) 38–41% в опыте по сравнению с 25% в контроле-2. Исследования в данном направлении продолжаются.

Таблица 2

Регенерация глаз у планарий *Girardia tigrina* под воздействием серотонина (серединки). Количество особей и их процент от общего числа животных

Группа, дата постановки опыта, день регенерации	Стадии регенерации фоторецепторов				Число особей
	Два глаза выражены хорошо	Два глаза, один выражен слабее	Один глаз	Без глаз	
Контроль-1 21/10/17 – 5-й день	17–36.2%	7–14.9% $\Sigma = 24–51.4\%$	15–31.9%	8–17.0%	n=47
Серотонин-1 (10-6М) 21/10/17 – 5-й день	30–49.2%	12–19.8% $\Sigma = 42–68.9\%$	14–23.0%	5–8.2%	n=61
Серотонин-1 (10-7М) 21/10/17 – 5-й день	27–42.9%	14–22.2% $\Sigma = 41–65.1\%$	12–19.0%	10–15.9%	n=63
Контроль-2 22/10/17 – 5-й день	13–25.5%	16–31.4% $\Sigma = 29–56.9\%$	11–21.6%	11–21.6%	n=51
Серотонин-2 (10-7М) 22/10/17 – 5-й день	21–41.2%	9–17.6% $\Sigma = 30–58.8\%$	15–29.4%	6–11.8%	n=51
Серотонин-3 (10-7М) 22/10/17 – 5-й день	21– 38.9%	11–20.4% $\Sigma = 32–59.3\%$	14–25.9%	8–14.8%	n=54

Вероятно, в ходе регенерационного процесса, вследствие падения естественного уровня биогенного амина после отсечения головного конца тела, экзогенный серотонин восполняет образовавшийся дефицит, стимулируя дифференцировку новых глаз.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-04-00349а.

Литература

1. MacRae E.K. The fine structure of photo receptors in a marine flatworm // Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 1966. Vol. 75. P. 469–484.
2. Седельников З.Ф., Знобищева А.В., Крещенко Н.Д. Наблюдение за регенерацией фоторецепторов у планарий *Girardia tigrina* (Platyhelminthes) // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2016. Вып. 17. С. 429–432.

3. Шейман И.М., Крещенко Н.Д., Нетреба М.В. Формирование функции фоторецепторной системы на ранних этапах развития // Биофизика. 2010. Т. 55. С. 680–685.
4. Крещенко Н.Д. Иммуноцитохимическая идентификация серотониновых нейронов у планарий *Girardia tigrina* // Биологические мембраны. 2016. Т. 33. С. 1–10.

References

1. MacRae E.K. The fine structure of photo receptors in a marine flatworm. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 1966; (75): 469–484.
2. Sedelnikov Z.F., Znobishcheva A.V., Kreshchenko N.D. Observations on photoreceptors regeneration in planarian *Girardia tigrina*. *Theory and practice of struggle against parasitic diseases*. 2016; (17): 429–432. (In Russ.)
3. Sheiman I.M., Kreshchenko N.D., Netreba M.V. Formation of the photosensing system function in early development. *Biophysika*. 2010; (55): 680–685. (In Russ.)
4. Kreshchenko N.D. Immunocytochemical identification of serotonergic neurons in planarians *Girardia tigrina*. *Biological membranes*. 2016; (33): 1–10. (In Russ.)