СЕРОТОНИН УСКОРЯЛ РЕГЕНЕРАЦИЮ ГОЛОВНОГО КОНЦА ТЕЛА У ПЛАНАРИЙ *SCHMIDTEA MEDITERRANEA* И *GIRARDIA TIGRINA* (PLATYHELMINTHES)

Крещенко Н. Д.¹, Гребенщиков Н. И.²,
Гребенщикова Е. В.¹, Карпов А. Н.¹

Аннотация

В работе приводятся результаты опытов о влиянии нейромедиатора серотонина на рост головной регенерационной бласты, формирующейся в ходе регенерационного процесса у планарий. Измеряли, с помощью метода прижизненной компьютерной морфометрии, площадь бласты у регенерирующих контрольных и подопытных животных, находившихся под воздействием серотонина. Наблюдения указывают на ускорение процесса регенерации под действием серотонина. Стимулирующий эффект был достоверным на 2 и/или 3 сутки после декапитации. Обсуждается морфогенетический эффект серотонина у планарий.

Ключевые слова: серотонин, планарии, плоские черви, регенерация, морфогенез.

SEROTONIN ACCELERATES HEAD END REGENERATION IN PLANARIAN *SCHMIDTEA MEDITERRANEA* AND *GIRARDIA TIGRINA* (PLATYHELMINTHES)

Kreshchenko N. D.¹, Grebenshchikov N. I.²,
Grebenshchikova E. V.¹, Karpov A. N.¹

Abstract

Free-living flatworms – planarians possess fascinated regenerative ability amongst metazoan. They can regenerate whole organism from small body piece. Precise

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

² ФГБОУ Национальный исследовательский Университет МЭИ, Москва

¹ Institute of Cell Biophysics RAS, 142290, Pushchino, Moscow Region, Institutskaya str., 3;

² Research University "Moscow Power Engineering Institute", Moscow

mechanisms of its regeneration remain poorly investigated. The results of the experiments on head blastema growth, which was formed in regenerating planarians *Schmidtea mediterranea* and *Girardia tigrina* after decapitation, have been presented. Planarians were operated with thin scalpel under dissecting microscope and left for regeneration. Animals from control group were kept in normal water. And to the experimental group of animals the solutions of the serotonin in concentration of 0.1 and 1 μM have been added. The experiments were repeated several times. With the methods of vital computer morphometry the areas of blastemas were measured in regenerating control and experimental (treated with serotonin) planarians. The results were analyzed by t-Student statistical method. The observation indicated the acceleration of blastema growth under serotonin treatment (0.1–1 μM) in two planarian species — *S. mediterranea* and *G. tigrina*. Stimulating effect of serotonin has attained the level of significance on day 2 or day 3 after the operation. Serotonin is known as regulator of neural development in vertebrate organisms. In present work the morphogenetic action of biogenic amine, serotonin, in lower metazoan is postulated.

Keywords: serotonin, planarian, flatworms, regeneration, morphogenesis

Введение. Несмотря на интенсивные исследования механизмов регенерации, способы запуска и реализации этого процесса остаются нераскрытыми. Ключом к разгадке феномена регенерации могут послужить исследования, проводимые на простых биологических объектах. Пресноводные плоские черви, планарии, обладают непревзойденной регенерационной способностью и могут восстанавливать любую часть тела или орган в ответ на повреждение. Процесс регенерации хорошо поддается описанию с помощью количественных показателей [1].

Серотонин — ключевой нейромедиатор в нервной системе позвоночных животных и человека. Как нейротрансмиттер, серотонин регулирует чувство голода, температуру тела, болевую чувствительность, модулирует настроение, возбуждение, сексуальное поведение и выделение гормонов. Серотонин обнаружен также во всех классах паразитических плоских червей [2], в том числе, у планарий [3]. Он локализуется в нейронах центральных и периферических отделов нервной системы. Среди плоских червей, основные сведения о функциональной роли серотонина в организме получены, в основном, у паразитических представителей данного таксона. Это обусловлено важным экономическим и медицинским значением этих животных и проводимых на них исследований. Гормональная роль серотонина у планарий остается практически неизученной. В связи с вышеизложенным проведены исследования функциональной роли серотонина

у планарий, с использованием разработанных морфогенетических моделей [4], в частности – регенерации головного конца тела.

Материалы и методы. В работе использовали планарий бесполой лабораторной расы *Schmidtea mediterranea* и *Girardia tigrina* (*Turbellaria*, *Platyhelminthes*), которых содержали в затемненных аквариумах с водопроводной и дистиллированной водой (2:1) при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$ и кормили два раза в неделю. В опыт отбирались особи длиной около 5–6 мм. Перед экспериментом животных держали голодными в течение 7 дней. Операцию проводили под бинокулярным микроскопом, используя лед для обездвижения и анестезии животных. Тонким глазным скальпелем отсекали головной конец тела, и помещали для регенерации в раствор серотонина гидрохлорида (Sigma) (подопытная группа) или воду (контрольная группа). Опыты повторяли несколько раз. В каждой серии опытов был свой контроль.

Регенерирующих планарий подопытной и контрольной групп фотографировали через 48 ч и 72 ч после операции с помощью цифровой фотокамеры Scopetek DCM130E (Микромед), соединенной с бинокулярным микроскопом МБС-10 (СССР), при увеличении объектива $\times 2$. Файлы изображений, размером 1280x1024 пкс. хранили в формате JPEG. Изображения (см. Рис. 1б, в) анализировали с помощью программы AxioVision Rel4.8 (Zeiss) для микроскопии. Измеряли площадь головной регенерационной бластемы, находили ее среднее значение, стандартное отклонение. С помощью программы GraphPad Prism (США) проводили статистический анализ данных с помощью *t*-критерия.

Результаты исследований. Наблюдали за восстановлением головного конца тела у планарий *S. mediterranea* и *G. tigrina* на 2 и 3 сут после операции. Результаты опытов (табл. 1) показали, что серотонин в концентрации 0.1–1 μM стимулировал формирование на раневой поверхности головной регенерационной бластемы, а также ее рост, у планарий *S. mediterranea* и *G. tigrina*. Так, например, площадь головной бластемы через 48 ч после операции в одной из подопытных групп составила 138,1% от контроля, различия были достоверными при $p < 0.0001$ (***). Через 72 ч после удаления головного конца тела положительный эффект серотонина сохранялся (118,8% от контроля, $p = 0.0410$ (*).

Как можно видеть из табл. 1 у *S. mediterranea* в 4-х повторных экспериментах площадь регенерационной бластемы в подопытных группах была больше, чем у контрольных животных (на 2-е и/или 3-и сутки

Рис. 1. Слева (а) — фото планарии *Girardia tigrina*, стрелкой указана мускулистая глотка, расположенная в центре тела, масштаб — 1 мм; в центре (б) и справа (в) — формирование головной регенерационной бластемы (непигментированный апикальный участок новой ткани); 48 ч регенерации (фото в центре); 78 ч регенерации (фото справа)

регенерации), и в трех из четырех опытов различия достигали уровня достоверности. Сходное действие серотонин проявлял и у планарий *G. tigrina* — стимулировал рост бластемы, однако различия были менее выражены и составили 112,9–115,9% от контрольного уровня.

Таблица 1

Регенерация головного конца тела у планарий *Schmidtea mediterranea* (S.m) и *Girardia tigrina* (G.t) под воздействием серотонина. Средняя площадь регенерационной бластемы (10^{-2} мм²) и стандартное отклонение

Группа	Время регенерации		Число особей
	48 часов	72 часа	
Контроль (S.m)	2.733±0.5668	4.864±0.8510	n=20
Серотонин (10-6М)	2.943±0.5508	5.351±1.0976*	n=20
Контроль (S.m)	2.405±0.5538	4.398±0.2299	n=24
Серотонин (10-6М)	3.321±0.7344***	5.224±0.2466*	n=24
Контроль (S.m)	3.118±0.6035	4.897±0.5233	n=15
Серотонин (10-6М)	3.293±0.4917	5.289±1.1963	n=15
Контроль (S.m)	2.859±0.7241	3.966±0.1770	n=20
Серотонин (10-6М)	3.415±0.6854**	4.723±0.3144*	n=20
Контроль (G.t)	4.397±1.009	5.301±1.2450	n=15
Серотонин (10-6М)	4.493±0.7309	6.144±1.2170*	n=15
Контроль (G.t)	5.241±1.143	7.707±1.834	n=20
Серотонин (10-7М)	5.921±1.499*	7.907±1.792	n=20

Примечание: *, **, *** — степени достоверности различий, (t-test)

Заключение. Серотонин — является регулятором процессов в развитии нейронов в мозге млекопитающих. Он вовлечён в процессы созревания ряда структур головного мозга: префронтального кортекса, некоторых отделов лимбической системы [5, 6]. У организмов, стоящих на более низких ступенях эволюционного развития, морфогенетическая функция серотонина также может быть обнаружена. Так, в настоящей работе, при изучении процесса регенерации головного конца тела у планарий, серотонин продемонстрировал свои морфогенетические свойства, оказывая стимулирующее влияние на рост головной регенерационной blastемы у двух видов планарий — *S. mediterranea* и *G. tigrina*. Исследования в данном направлении будут продолжены.

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

Литература

1. Шейман И.М., Крещенко Н.Д. Регенерация планарий: экспериментальный объект. Онтогенез. 2015. Т. 46. С. 3–12.
2. Теренина Н.Б., Густафссон М.К.С. Функциональная морфология нервной системы паразитических плоских червей (трематоды, цестоды). М.: КМК, 2014. 290 с.
3. Крещенко Н.Д. Иммуноцитохимическая идентификация серотонинергических нейронов у планарий *Girardia tigrina* // Биологические мембраны. 2016. Т. 33. С. 1–10.
4. Kreshchenko N., Sedelnikov Z., Sheiman I., Reuter M., Maule A., Gustafsson M.K.S. Functions of flatworm neuropeptides NPF, GYIRF and FMRF in course of pharyngeal regeneration of anterior body fragments of planarian, *Girardia tigrina* // Cell and Tissue Research. 2008. Vol. 331. P. 739–750.
5. Ходжай Л.И., Отеллин В.А. Синаптогенез в дорсальном ядре шва продолговатого мозга крысы в условиях дефицита серотонина // Морфология. 2012. Т. 142. № 6. С. 20–24.
6. Ходжай Л.И. Экспрессия серотонинового транспортера в дорсальном ядре шва в ранний постнатальный период в норме и при перенатальной недостаточности серотонинергической системы у крыс // Журнал эволюц. биох. физиол. 2016. Т. 1. С. 67–72.

References

1. Sheiman I.M., Kreshchenko N.D. Planarian regeneration: an experimental object. *Ontogenez*. 2015; 46: 3–12. (In Russ.)
2. Terenina N.B., Gustafsson M.K.S. Functional morphology of the nervous system of parasitic flatworms (trematoda, cestoda). M.: KMK, 2014. 290 p. (In Russ.)
3. Kreshchenko N.D. Immunocytochemical identification of serotonergic neurons in planarians *Girardia tigrina*. *Biologicheskie membrany*. 2016.; 33: 1–10. (In Russ.)
4. Kreshchenko N., Sedelnikov Z., Sheiman I., Reuter M., Maule A., Gustafsson M.K.S. Functions of flatworm neuropeptides NPF, GYIRF and FMRF in course of pharyngeal regeneration of anterior body fragments of planarian, *Girardia tigrina*. *Cell and Tissue Research*. 2008; (331): 739–750. (In Russ.)
5. Khozhai L.I., Otellin V.A. Synaptogenesis in the dorsal raphe nucleus of rat medulla oblongata in serotonin deficiency. *Morphologia*. 2012; 142(6): 20–24. (In Russ.)
6. Khodgai L.I. Expression of serotonin transporter in the dorsal raphe nucleus during the early postnatal period in normal state and under prenatal deficiency of the serotonergic system in rats. *Zhurn. Evol. Biochem. Physiol.* 2016; 1: 67–72. (In Russ.)