

ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ГЛАЗ У МНОГОГЛАЗЫХ ПЛАНАРИЙ *Polycelis tenuis*

© 2007 г. И. М. Шейман, З. В. Седельников*

Институт биофизики клетки РАН

*Пуцинский государственный университет

142290 Пушкино, Московская обл.

E-mail: sheiman@icb.psn.ru

Поступила в редакцию 19.04.06 г.

Окончательный вариант получен 10.07.06 г.

У планарий *Polycelis tenuis*, передний конец тела которых окаймлен многочисленными глазами, изучена регенерация и отрицательный фототаксис. Приведены сравнительные данные по тем же показателям у двуглазых планарий *Girardia tigrina*. Множественные глаза регенерировали постепенно со снижением скорости регенерации и независимо от темпа восстановления переднего конца тела, на котором они расположены. Реакция отрицательного фототаксиса восстанавливалась независимо от общего числа восстановленных глаз и носила неустойчивый характер у планарий обоих видов.

Ключевые слова: планарии, многоглазые, регенерация, отрицательный фототаксис.

У планарий существуют оформленные фоторецепторные структуры – глаза, которые отличаются у разных видов как по числу, так и по расположению. Самые распространенные представители рода *Dugesia* имеют два глаза на головном конце тела над “мозгом”. Множественные глаза располагаются группами или цепочкой. Наиболее известные виды многоглазых планарий, у которых имеются краевые глаза, окаймляющие передний конец тела, относятся к роду *Polycelis*. Парные глаза планарий были исследованы разными методами (Sopott-Ehlers, 1991; Pineda et al., 2000; Salo et al., 2002), чего нельзя сказать о множественных. В последние годы интерес к исследованию глаз планарий связан с проблемой эволюции фоторецепторов (Fernald, 2000). В литературе отсутствуют сравнительные данные о формировании, развитии и регенерации глаз у разных видов планарий в связи с их функционированием.

Предполагаем, что восстановление глаз в ходе регенерации планарий может ответить на вопрос о связи восстановительных и функциональных событий, таких как зависимость реакций на свет от наличия глаз и от их числа. Одновременно регенерация глаз у планарий может служить удобной моделью морфогенеза. Этому способствует четкое внешнее морфологическое выражение (время появления глаз и динамика их числа у многоглазых планарий) и функциональное проявление (отрицательный фототаксис). Задача данной работы – изучить регенерацию глаз у многогла-

зых планарий и сравнить результаты с исследованиями регенерации глаз на двуглазых планариях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на двуглазых (*Girardia tigrina*) и многоглазых (*Polycelis tenuis*) планариях. Планарий обоих видов разрезали перед глоткой на головной и хвостовой фрагменты. Кормление регенератов начинали через 3 нед после операции. Восстановление глаз изучали на хвостовых фрагментах. Для удобства подсчета глаз у многоглазых планарий использовали их изображение на экране компьютера AMD Athlon, которое получали с помощью видеокамеры WAT-902DM (“WATEC”, Япония), вмонтированной в бинокляр МБС-10. Съёмку планарий проводили ежедневно в течение месяца, а затем один раз в 3 сут до времени восстановления числа глаз, присущего интактным планариям. На тех же изображениях измеряли длины тела и бластемы, которые выражали в условных единицах (1 мм = 36 усл. ед.). Для исследования фототаксиса планарий помещали в кристаллизаторы ($\varnothing = 23$ см) с водой и камнем посередине. Сбоку направляли свет от лампы накаливания (100 Вт). Градиент освещенности в кристаллизаторе измеряли с помощью люксметра, он составлял 550–400 Лк.

Опыты по изучению реакций на свет проводили ежедневно на интактных планариях и на фрагментах спустя 1 сут после операции. Обычно планарии плавали некоторое время по дну кристаллизатора, затем прятались под камень. Фототаксис ха-

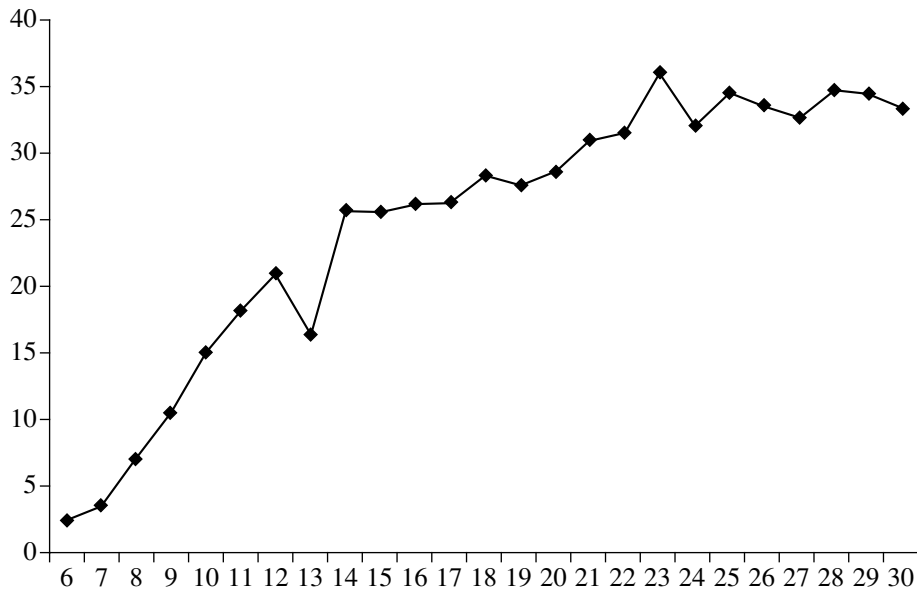


Рис. 1. Динамика восстановления глаз у 100 планарий *P. tenuis* после удаления передней части тела. По оси абсцисс – время после операции, сут; по оси ординат – среднее число глаз у одной особи.

рактизовали числом реакций избегания света в группах из 20 особей. Число планарий, находящихся под камнем, подсчитывали каждые 10 мин в течение 30 или 50 мин. опыты ставили отдельно на группах интактных и регенерирующих планарий, находящихся в одинаковых условиях при температуре 20–21°C. Все опыты были проведены в зимний период (декабрь–январь).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Восстановление глаз у планарий *P. tenuis*. Регенерация глаз у дву- и многоглазых планарий имеет свои особенности. У двуглазых планарий *G. tigrina* восстановление обоих глаз происходит на 5–6-е сут регенерации. У интактных планарий *P. tenuis* число глаз колеблется от 40 до 100, а иногда выходит за эти пределы. У головных фрагментов этих животных глаза полностью сохраняются. Первые глаза у хвостовых регенератов появляются на 6-е сут регенерации. Затем их число постепенно увеличивается. Наблюдение мы вели до приближения их числа к близкому для интактных планарий. Через 2 нед скорость появления новых глаз постепенно снижается (рис. 1). Первые 20 глаз восстанавливаются спустя 2 нед после начала регенерации. Следующие 20 глаз – еще через 26 сут, после чего процесс восстановления продолжает замедляться; 60 глаз мы определили только на 96-е сут от начала регенерации.

Первые глаза появляются по бокам бластемы. Следующие глаза окаймляют весь передний и боковые края тела планарий. С ростом числа увеличивается плотность их расположения, особенно

по переднему краю головного конца (рис. 2). На протяжении 3 нед они хорошо различимы на фоне светлой бластемы. Позже, когда у планарий восстанавливается пигментация, глаза в виде черных точек все еще хорошо видны по краям тела.

Регенерация головного конца тела *P. tenuis*. В отдельной серии опытов мы исследовали параллельно рост регенерирующего хвостового фрагмента и восстановление глаз. Вначале у интактных планарий измеряли длину всего тела и его передней части, в которой находились глаза, а также общее число глаз. Между величиной участка с глазами и их числом не было обнаружено определенной зависимости, и эти величины сильно варьировали у разных планарий, что видно по стандартному отклонению (табл. 1). На хвостовых регенератах такие же измерения производили один раз в неделю. Общая длина регенератов и длина регенерирующей части – бластемы – со временем увеличивались. Одновременно росло и число глаз по краям передней части тела. Этот показатель у разных планарий очень отличался, как это было отмечено и для интактных планарий (табл. 1). Отличалась и динамика увеличения числа глаз на протяжении месяца.

Как показали отношения длины участка, содержащего глаза, или длины бластемы к количеству глаз, между ростом бластемы и числом регенерирующих глаз нет прямой зависимости (рис. 3).

Отрицательный фототаксис. В природе и в лабораторных условиях планарии проявляют реакции избегания света, или отрицательный фототаксис. При этом они прячутся на нижней поверхности растений, камней или других предметов.

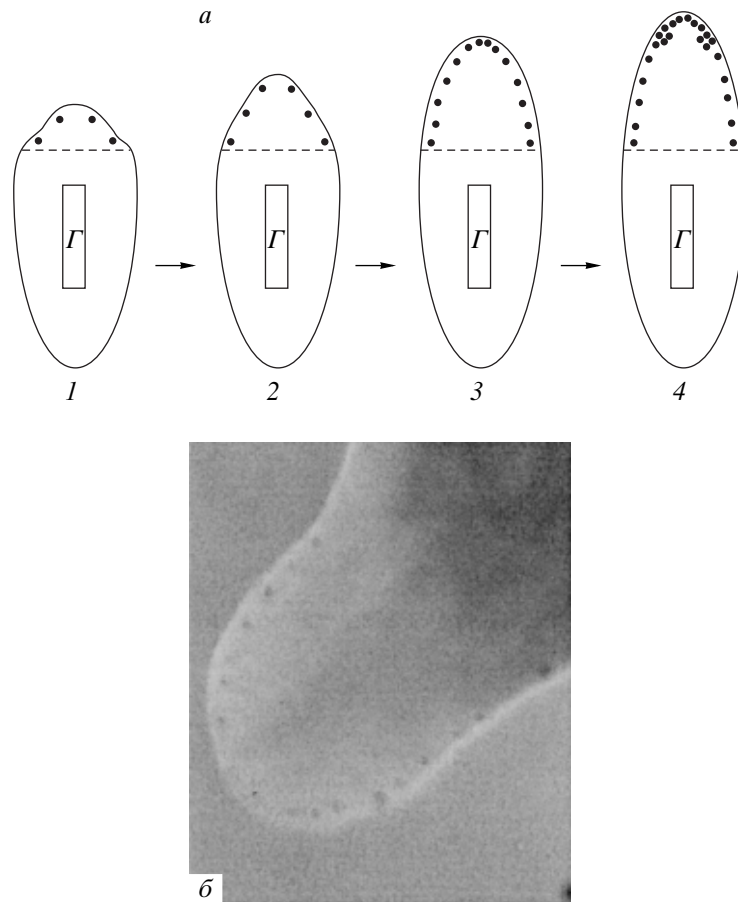


Рис. 2. Восстановление глаз у планарий *P. tenuis*.

a – схема (1–4 – последовательные этапы восстановления в течение 1 мес); *б* – макрофотография, увел.: $\times 20$.

Г – глотка, (– –) – отделение бластемы у хвостового регенерата.

В лабораторных условиях планарии покидают свои укрытия на время принятия пищи или при помещении их в непривычные условия, проявляя ориентировочную реакцию. Для характеристики реакций избегания ежедневно подсчитывали число планарий, находящихся под камнем в конце опыта, а также по 10-минутным интервалам на разных этапах регенерации. Планарии двух видов

отличались как по числу глаз, так и по поведению: *P. tenuis* были менее подвижны, чем *G. tigrina*.

В течение двух недель число реакций избегания у интактных планарий *G. tigrina* постоянно колебалось. После перерезки у головных фрагментов реакции избегания проявлялись с первых же суток восстановления хвостового отдела, а в последующие сутки реакция избегания колебалась. При этом число таких ответов иногда превосходило число реакций у интактных планарий. У хвостовых регенератов реакции избегания света появились только на 5-е сут регенерации: первоначально у 20, а к 9-м сут – у 100% особей. Колебания числа реакций в разные дни у регенератов по своему характеру не отличались от таковых у интактных планарий (рис. 4, *a*). По ходу опыта интактные планарии то прятались под камень, то уплывали из-под него, но число реакций избегания в целом увеличивалось от первоначального периода (10 мин) до последнего (40–50 мин) как в начале исследования, так и в его конце. В 1-е сут после перерезки головные регенераты

Таблица 1. Восстановление переднего отдела тела планарии *P. tenuis*

Планарии, нед после операции	Средняя длина, мм		Число глаз
	тела	участка с глазами	
Интактные	992 ± 149	262 ± 43	61 ± 17
1	594 ± 104	47 ± 12	2 ± 1
2	694 ± 149	91 ± 23	17 ± 7
3	664 ± 118	115 ± 35	29 ± 10
4	773 ± 185	121 ± 35	20 ± 8

наиболее активны, а в середине и в конце опытов (7-е и 13-е сут) вели себя, подобно интактным планариям. В целом по ходу опытов хвостовые регенераты проявляли меньшую активность (табл. 2).

Интактные планарии *P. tenuis* избегали света неравномерно в разные дни наблюдений. У головных фрагментов реакции избегания света проявлялись сразу после перерезки, и в разные периоды регенерации их число также колебалось. На протяжении месяца после перерезки оно было выше, чем у интактных планарий. У хвостовых регенератов реакции появлялись только на 13-е сут регенерации и в дальнейшем их число варьировало, оставаясь в среднем меньше, чем у интактных планарий и у головных регенератов.

Для оценки восстановления реакций избегания света у регенератов на протяжении месяца сравнивали среднее число реакций с таковым у интактных планарий в пяти последовательных опытах в первой и последней декадах месяца (рис. 4, б). Сравнение числа реакций у головных регенератов и интактных планарий не обнаружило достоверных отличий, хотя у головных регенератов на-

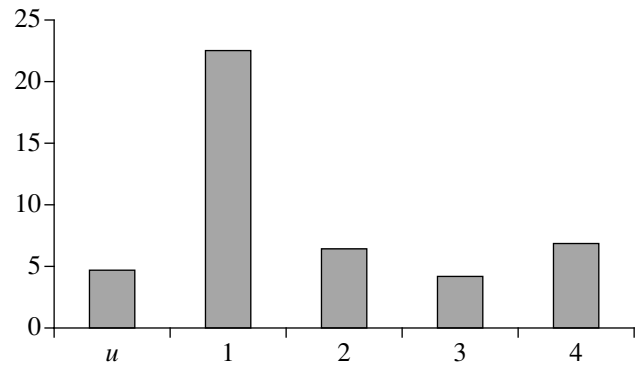


Рис. 3. Отношение между длиной части тела с глазами и числом глаз (по оси ординат) у интактной планарии (u) и между длиной бластемы и числом восстановленных глаз в процессе регенерации. По оси абсцисс – время после операции, нед.

блюдалась тенденция к развитию большего числа реакций, чем у интактных планарий; различий не наблюдали также в первой декаде после перерезки по сравнению с третьей. В группе хвостовых фрагментов реакция избегания света в последней

Таблица 2. Динамика проявления реакций избегания света у планарий *D. tigrina*

Минуты	Сутки								
	1-е			7-е			13-е		
	интактные особи	фрагменты		интактные особи	фрагменты		интактные особи	фрагменты	
		головные	хвостовые		головные	хвостовые		головные	хвостовые
10	4	17	0	5	3	5	4	4	3
20	5	17	0	7	5	5	3	3	1
30	13	18	0	11	6	4	4	4	2
40	8	18	0	14	4	5	10	10	4
50	9	18	0	9	9	6	10	10	4

Примечание. Здесь и в табл. 3 число исследованных планарий $n = 20$.

Таблица 3. Динамика проявления реакций избегания света у планарий *P. tenuis*

Минуты	Сутки											
	1-е			7-е			13-е			30-е		
	интактные особи	фрагменты		интактные особи	фрагменты		интактные особи	фрагменты		интактные особи	фрагменты	
		головные	хвостовые		головные	хвостовые		головные	хвостовые		головные	хвостовые
10	1	6	0	8	16	0	10	16	5	18	12	10
20	0	9	0	12	17	0	10	16	6	18	12	10
30	0	10	0	14	17	0	10	16	4	18	12	10
40	0	11	0	18	19	0	10	17	4	19	7	10
50	3	11	0	20	19	0	11	17	4	19	9	10

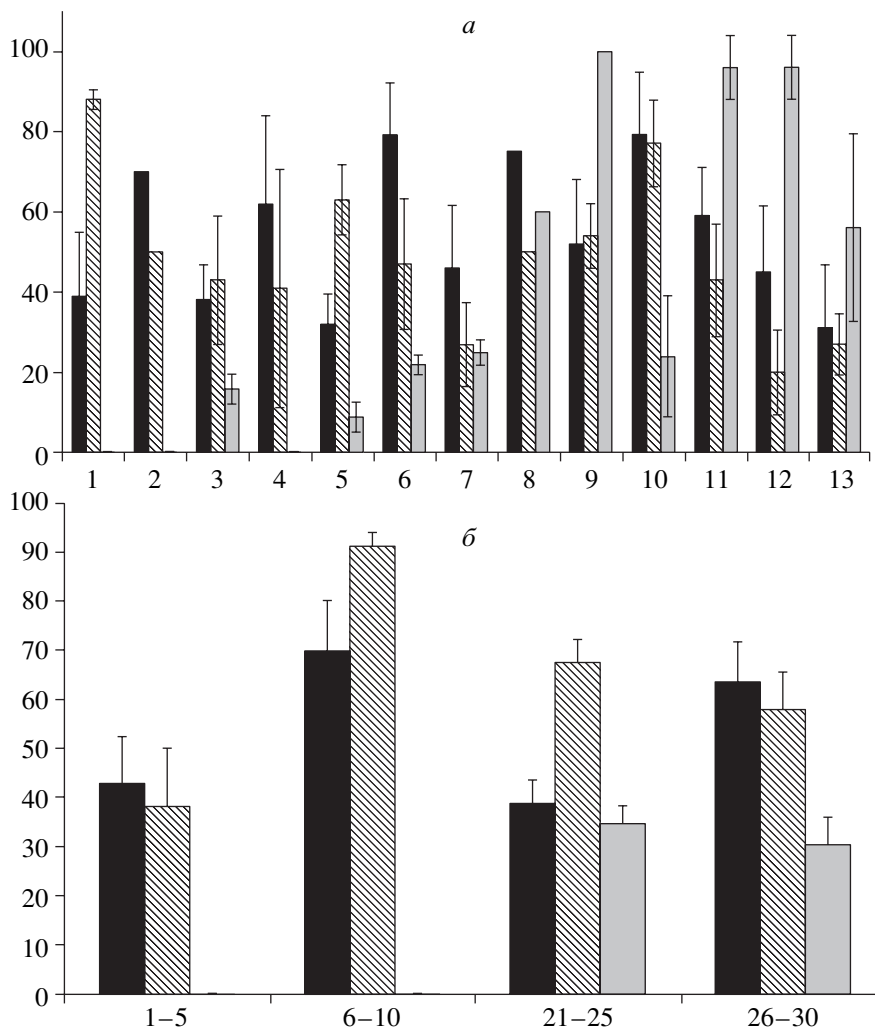


Рис. 4. Динамика проявления реакций избегания света у *G. tigrina* (а) и *P. tenuis* (б). По оси абсцисс – время после операции, сут; по оси ординат – среднее число реакций в сутки в группах по 20 особей, %.

(■) – intactные животные, (▨) – головные регенераты, (□) – хвостовые регенераты.

декаде регенерации проявлялась в среднем у 30% фрагментов.

Выборочный анализ динамики числа реакций избегания света по ходу опыта обнаружил у intactных планарий замедление проявления реакций. В 1-е сут исследований они почти не реагировали на световое раздражение, затем в первые 10 мин опыта начинали реагировать. Однако в последующие 10-минутные интервалы времени они оставались в том же положении – под камнем. На 7-е сут опытов у intactных животных произошло изменение числа реакций по ходу опыта.

Головные регенераты были в первом же опыте после перерезки более активны, чем intactные планарии, и обнаружили изменение числа реакций по ходу опыта. На 7-е, 13-е и 30-е сут опытов число реакций у них также изменялось. У хвостовых регенератов число реакций отрица-

тельного фототаксиса оказалось более стабильным (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе мы исследовали морфофункциональные характеристики фоторецепторов у двуглазых (*G. tigrina*) и многоглазых (*P. tenuis*) планарий в ходе их регенерации. Исходное морфологическое отличие между ними состоит в числе и расположении глаз. В структуре глаз описаны общие основные элементы: в глазу *Polycelis* имеется по одной пигментной и фоторецепторной клетке, а у двуглазых планарий таких клеток много (Carpenter et al., 1974; Sopott-Ehlers, 1991; Kuchiiva et al., 1991). У intactных многоглазых планарий оказалось разное число глаз, которое не коррелировало с длиной тела. Во время регенерации хвостового фрагмента по мере отрастания нового голов-

ного конца мы также не отметили зависимости числа восстановленных глаз от роста бластемы. Этот вывод находится в противоречии с утверждением о наличии такой зависимости, установленной при изучении длительно голодавших планарий при уменьшении и восстановлении их массы (Aikava, Shimozava, 1991). Вместе с тем этот вывод соответствует обнаруженным ранее различиям в характере регенерации разных частей тела планарий (Шейман и др., 2006).

Реакции отрицательного фототаксиса в виде избегания светового раздражения позволили оценить восстановление функциональных свойств глаз. Оказалось, что по числу реакций избегания у интактных планарий в целом оба вида мало отличаются. При этом динамика проявления реакций была различной. Планарии *P. tenuis* оставались под камнем в течение всего опыта и только изредка выплывали, в то время как *G. tigrina* отличались подвижностью. Таким образом, *P. tenuis* проявили большую двигательную инертность по сравнению с *G. tigrina*, однако в последующие дни опытов у обоих видов планарий имели место сходные колебания числа реакций. Такие же колебания проявлялись у головных фрагментов обоих видов планарий вскоре после перерезки тела и в ходе регенерации. Сходным было и превосходство числа реакций избегания у головных фрагментов в начале регенерации по отношению к интактным планариям. Наконец, во время регенерации хвостовых фрагментов восстановление глаз у обоих видов не определяло числа реакций избегания, и морфологическое созревание глаз предшествовало их функциональному проявлению.

Кроме перечисленных проявлений сходных функциональных черт у двух видов планарий имелись и различия. При регенерации хвостовых фрагментов глаза *G. tigrina* регенерировали в течение 5 сут, как и другие системы планарий, в том числе головной ганглий (Шейман, 1984). И в это же время у них восстанавливались первые реакции избегания света, число которых в дальнейшем колебалось. У *P. tenuis* головной ганглий регенерировал так же, как у *G. tigrina*, в течение 5 сут (Богоровская, 1969), но глаза у них восстанавливались постепенно, с замедлением, и не достигали исходного числа в течение месяца.

Предполагается, что регенерация глаз у двуглазых планарий контролируется “глазным регенерационным полем”, которое постепенно сужается и не функционирует для развития дополнительных глаз (Sakai et al., 2000). Возможно, что замедление в восстановлении множественных глаз связано также с постепенным истощением или сужением “глазного регенерационного поля”, если оно имеется у всех планарий и если считать,

что множественные глаза у многоглазых планарий являются дополнительными.

Реакции избегания света у хвостовых фрагментов появлялись позднее, чем восстанавливались первые глаза. Их число в разные дни колебалось, но было меньше, чем у головных регенератов и у интактных планарий. В работе на многоглазых планариях *Polycelis nigra* была установлена зависимость регенерации глаз от наличия ганглия (Wolff, Lender, 1950). Как было отмечено, ганглий регенерирует в течение 5 сут. За это время восстанавливаются не только структура ганглия, но и его функциональные характеристики (Шейман, 1984). Следовательно, как постепенное появление множественных глаз зависит не только от ганглия, так и особенности реакций избегания света у регенерирующих планарий зависят не столько от ганглия, сколько непосредственно от функционирования глаз.

Превышение числа реакций избегания при регенерации сохранивших глаза головных фрагментов планарий обоих видов по сравнению с числом реакций у интактных планарий может быть объяснено действием в регенератах стимулирующих факторов регенерации общего действия (Шейман, 1984). Колебания числа реакций избегания у обоих видов планарий, как интактных, так и регенератов, свидетельствуют о неустойчивости функциональных свойств фоторецепторов. Последнее наряду с отсутствием гомологии в развитии ультраструктуры глаз у разных видов планарий (Попова, Мамкаев, 1985; Sopott-Ehlers, 1991), вероятно, отражает определенный этап в эволюции фоторецепции. Для подтверждения этого предположения требуются дополнительные исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Богоровская Г.И. Регенерация нервной системы планарий *Ijimia tenuis* // Цитология. 1969. Т. 11. С. 964–972.
- Попова Н.В., Мамкаев Ю.В. Ультраструктура глаз *Convoluta convoluta* (Turbellaria, Acoela) и их примитивные особенности // ДАН СССР. 1985. Т. 283. С. 756–759.
- Шейман И.М. Регуляторы морфогенеза и их адаптивная роль. М.: Наука, 1984. 174 с.
- Шейман И.М., Седельников З.В., Крещенко Н.Д. Ресурсы регенерации у планарий // Онтогенез. 2006. Т. 37. С. 27–31.
- Aikava M., Shimozava A. The multiple eyes of *Polycelis*. 1. Relation between the number of eyes and body length // Hydrobiology. 1991. V. 227. P. 257–262.
- Carpenter K.S., Morita M., Best J.B. Ultrastructure of the photoreceptor of the planarian *Dugesia dorotocephala* normal eye // Cell Tis. Res. 1974. V. 148. P. 143–158.
- Fernald R.D. Evolution of eyes // Cur. Opin. Neurobiol. 2000. V. 10. P. 444–450.

Kuchiiva T., Kuchiiva S., Teshirogi W. Comparative morphological studies on the visual systems in a binocular and a multi – ocular species of freshwater planarian // *Hydrobiologia*. 1991. V. 227. P. 241–249.

Pineda D., Gonzales J., Callaerts P. et al. Searching for the prototypic eye genetic network: Sine oculis is essential for eye regeneration in planarians // *PNAS*. 2000. V. 97. № 9. P. 4525–4529.

Sakai F., Agata K., Orii H., Watanabe K. Organization and regeneration ability of spontaneous supernumerary eyes in planarians – eye regeneration field and pathway selection by optic nerves // *Zool. Sci*. 2000. V. 17. P. 375–381.

Salo E., Pineda D., Marsal M. et al. Genetic network of the eye in Platyhelminthes: expression and functional analysis of some players during planarian regeneration // *Gene*. 2002. V. 287. P. 67–74.

Sopot-Ehlers B. Comparative morphology of photoreceptors in free-living plathelminths – a survey // *Hydrobiologia*. 1991. V. 227. P. 231–239.

Wolff E., Lender Th. Sur le determinisme de la regeneration des yeux chez une planaire d'eau douce *Polycelis nigra* // *C.R. Soc. Biol*. 1950. V. 144. P. 1213–1216.

Specific Features of Eye Regeneration in Multiocular Planarians *Polycelis tenuis*

I. M. Sheiman and Z. V. Sedel'nikov*

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences

**Pushchino State University,*

Pushchino, Moscow Oblast, 142290 Russia

E-mail: sheiman@icb.psn.ru

Abstract—Regeneration and negative phototaxis were studied in planarians *Polycelis tenuis*, in which the anterior body end is fringed with many eyes. Comparative data for the same indices are given for binocular planarians *Girardia tigrina*. Multiple eyes regenerated gradually with a decrease in the rate of regeneration and independently from the rate of restoration of the anterior body end, where they are located. Negative phototaxis was restored independently from the total amount of regenerated eyes. It was unstable in both planarian species.

Key words: planarians, multiocular, regeneration, negative, phototaxis.