

УДК 595.123.41-116.9+504.45.054-34

## ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ У ДВУХ ВИДОВ ПРЕСНОВОДНЫХ ПЛАНАРИЙ ПРИ НАКОПЛЕНИИ РТУТЬОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

© 2008 г. И. В. Медведев

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

152742 пос. Борок, Ярославская обл.

E-mail: medigo@ibiw.yaroslavl.ru

Поступила в редакцию 08.02.07 г.

Окончательный вариант получен 30.05.07 г.

С помощью морфометрических методов изучали скорость регенерации у планарий *Polycelis tenuis* и *Dugesia lugubris* после различных сроков содержания на кормовых субстратах с высокой (0.30–0.50 мг/кг сырого веса) и низкой (0.02–0.07 мг/кг) концентрацией ртутьорганических соединений. Определяли рост планарий и отношение площади регенерирующих тканей к площади всего фрагмента после поперечного рассечения планарий. Скорость увеличения размеров у животных с высоким содержанием ртутьорганических соединений была ниже по сравнению с таковой у животных с низким содержанием. Выяснено, что относительный прирост площади тела после операции был наибольшим у планарий *D. lugubris*, абсолютный – у планарий *Polycelis tenuis*. Таким образом показано, что ртутьорганические соединения природного происхождения способны ингибировать процесс восстановления тканей у планарий и что это влияние имеет дозозависимость.

*Ключевые слова:* планарии, регенерация, ртутьорганические соединения.

Способность восстанавливать целостность организма после повреждения или утраты ткани является фундаментальным свойством живых организмов (Bronsted, 1969). Она может быть обнаружена во всех разветвлениях филогенетического древа – от простейших (Короткова, 1997) до высших млекопитающих (Карлсон, 1986) – и в ходе всего онтогенеза (Токин, 1959). В широком смысле регенерация – это замещение различных структур (от частей клеток до крупных частей тела) после естественного изнашивания или случайной утраты (Короткова, 1997).

Пресноводные планарии являются классическим объектом исследований регенерации благодаря очень высоким восстановительным способностям (Короткова, 1997).

Токсичность и метаболизм ртути изучают довольно активно с использованием различных методов, нескольких концентраций и довольно длительных периодов воздействия. Ртуть – химически активный металл, имеющий высокое сродство к различным макромолекулам и связывающийся с молекулами ДНК как *in vitro* так и *in vivo*, что приводит к модификации этих молекул (Grover et al., 2001).

Антропогенная эмиссия ртути в атмосферу соизмерима с ее количеством, участвующим в природном глобальном цикле (Fitzgerald, 1995). Од-

ним из важнейших свойств, отличающих ее от других тяжелых металлов, является метилирование в водоемах с образованием токсичных ртутьорганических соединений (метилртути), накапливающихся в тканях и органах водных животных. В водной пищевой цепи концентрация метилртути от звена к звену увеличивается, достигая максимального значения к ее концу (Bloom et al., 1991).

В водных экосистемах практически не существует соединений со столь сильным нейротоксическим эффектом, механизм воздействия которого на холоднокровных животных исследован недостаточно. Основная масса работ посвящена изучению влияния неорганических соединений ртути, менее токсичных по сравнению с ртутьорганическими (Rodier, 1995). О влиянии этих соединений на жизнедеятельность (и на их регенерацию в частности) хищных представителей группы плоских червей, являющихся постоянным компонентом биоценозов большинства водоемов, известно мало (Медведев, Комов, 2005).

Цель настоящего исследования – количественная оценка восстановительных процессов у двух видов пресноводных планарий – *Polycelis tenuis* и *Dugesia lugubris* – при разных уровнях накопления ртутьорганических соединений природного происхождения с помощью морфометрических методов.

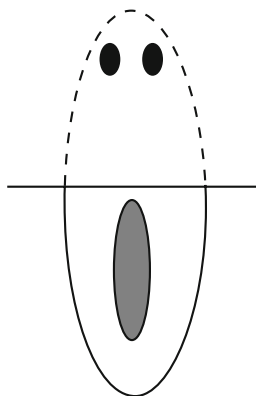


Рис. 1. Схема операции, проведенной на планариях *P. tenuis* и *D. lugubris*; (—) – место разреза.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Планарии *P. tenuis* встречаются в водоемах Западной Европы и Европейской части России, включая Ярославскую область (Порфирьева, Дыганова, 1987). Взрослые представители этого вида имеют длину 1–12 мм. Червей, отловленных в водоемах Ярославской области, размещали в аквариумах для откладки коконов. Спустя месяц после выхода из коконов животные, достигшие длины 10–12 мм, получали корм с низким (0.02–0.07 мг/кг сырого веса, первая группа) и высоким (0.30–0.50 мг/кг, вторая группа) содержанием ртутьорганических соединений на протяжении 6 мес.

Планарии *Dugesia lugubris* широко распространены в Западной и Средней Европе, а в Восточной не заходят дальше Волги (Порфирьева, Дыганова, 1987). Черви этого вида достигают 20 мм в длину. Как и с планариями *Polycelis tenuis*, в опытах использовали молодых животных спустя 1 мес после выхода из коконов. Червям этого вида корм с различным содержанием ртутьорганических соединений предлагали в течение 9 мес.

Планарий содержали в пластиковых пятилитровых емкостях при температуре 19–22°C и кормили два раза в неделю: *P. tenuis* – олигохетами *Enchytraeus albidus*, а *Dugesia lugubris* – личинками лабораторной культуры хирономид (*Chironomus riparius*). Способ выращивания олигохет и хирономид на рыбном фарше (рыба отловлена в Рыбинском водохранилище) с разными концентрациями ртути подробно описан ранее (Медведев, Комов, 2005). При проведении экспериментов учитывали не сроки содержания на корме с разной концентрацией соединений ртути, а уровень их накопления, который у разных видов различается.

В ходе эксперимента планариям *Polycelis tenuis* и *Dugesia lugubris* проводили поперечное рассечение перед глоткой и отбирали только хвостовые фрагменты (рис. 1), в которых после операции оставались фрагменты брюшных нервных ство-

лов. Как показывают исследования Тираса и Сахаровой (1984), у животных этих видов бластема отрастает только от центральной части раневой поверхности, и граница между новыми и старыми тканями, несмотря на постепенную пигментацию бластемы, длительное время хорошо видна.

Интенсивность роста вновь образующихся тканей у планарий изучали морфометрическим методом. Для регистрации границы новых тканей использовали фотосъемку с помощью фотонасадки МФН-5. Регенеранты планарий помещали в чашку Петри, дно которой было покрыто водой, и анализировали с помощью бинокля. Съемку животных проводили при 4-кратном увеличении, фотографии сканировали, затем полученные изображения оцифровывали и обрабатывали с помощью компьютера, используя программу Image Tool for Windows (версия 2.02). Для вычисления относительного роста тканей у регенерирующих планарий отдельно выделяли заново образованные ткани и весь регенерант целиком. Величины их площадей выражали в условных единицах.

В экспериментах использовали по 30 червей *Polycelis tenuis* в каждой группе животных, питавшихся олигохетами с высоким и низким содержанием ртутьорганических соединений, и по 19 особей вида *Dugesia lugubris*. Измерения планарий *Polycelis tenuis* и *Dugesia lugubris* проводили в течение 7 сут, начиная с 10-х сут регенерации. После операции у планарий обоих видов наблюдали мышечное сокращение в месте рассечения в течение 6–7 сут без дальнейшего увеличения в размерах. Только после этого промежутка времени у планарий начинался выраженный рост тканей. По этой причине фотографирование регенерантов начинали в более поздние сроки (на 10-е сут), чем описано в работах других исследователей (Шейман и др., 2004).

Анализ содержания ртути в корме и тканях планарий проводили методом атомной абсорбции холодного пара с использованием резонансной линии 237.7 нм на анализаторе ртути Юлия-5К (НПО “Метрология”, Казань). Сертифицированный биологический материал Dorn-II (мышцы акулы) со стандартным содержанием ртути получен из Канадского института химии окружающей среды.

Статистическую обработку полученных результатов проводили стандартными методами с использованием программы Statgraphics Plus для Windows (версия 2.1). Результаты выражали в виде средних значений и стандартных ошибок. Достоверность различий определяли в соответствии с *t*-критерием Стьюдента ( $p = 0.05$ ) (Sokal, Rohlf, 1995).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Содержание ртути в планариях.** Планарии *Polycelis tenuis* накапливали ртуть в десятки раз больше, чем ее содержалось в фарше и олигохетах, используемых в качестве корма (табл. 1). У червей, питавшихся олигохетами с высоким содержанием ртутьорганических соединений, уровень их накопления достигал 15.90 мг/кг сырого веса. У *Dugesia lugubris* уровень накопления ртутьорганических соединений соответствовал их содержанию в корме на протяжении 9 мес питания хирономидами с разным содержанием соединений ртути (табл. 1).

**Абсолютный рост вновь образующихся тканей у планарий.** Все планарии обычно покрыты пигментированным эпителием различных оттенков коричневого и черного цветов. В первые сутки регенерации бластема планарий была непигментированной. При рассмотрении животных под лупой бинокляра был виден четкий контраст между старыми пигментированными и вновь образованными, лишенными пигментных клеток, тканями регенеранта.

Спустя 10 сут после рассечения размеры вновь образованных тканей у *Polycelis tenuis* из первой группы увеличивались быстрее, чем у особей второй группы (рис. 2, а). Далее с 15-х до 17-х сут эти различия между площадью регенерирующих тканей у животных с низким и высоким содержанием ртутьорганических соединений носили достоверный характер.

У планарий *Dugesia lugubris* начиная с 10-х сут после операции и до конца наблюдений (17 сут) скорость формирования новых тканей у животных первой группы оказалась выше по сравнению с червями второй группы (высокое содержание ртутьорганических соединений). На 13- и 15-е сут после операции величина восстанавливаемого фрагмента тела после препарирования у планарий с низким содержанием ртутьорганических соединений была выше и достоверно отличалась от таковой у червей с их высоким содержанием (рис. 2, б).

**Относительный рост вновь образующихся тканей у планарий.** У *Polycelis tenuis* с низким содержанием ртутьорганических соединений (первая группа) прирост ткани по отношению к общей площади хвостового фрагмента с 10-х по 17-е сут составил 2%; у планарий с высоким – 1% (рис. 2, в).

У планарий *Dugesia lugubris*, несмотря на более интенсивный рост тела после операции у группы с низким содержанием ртутьорганических соединений по сравнению с таковым во второй группе, относительный прирост вновь образующихся тканей в обеих группах был сходен и составил 5 % (рис. 2, г). У планарий этого вида площадь всего фрагмента регенеранта в обеих

**Таблица 1.** Концентрация ртути у планарий *P. tenuis* и *D. lugubris*, мг/кг сырого веса

Объект исследования и время содержания в культуре, мес	Концентрация ртути	
	низкая	высокая
<i>P. tenuis</i> , 6	3.39 ± 0.07	15.97 ± 0.24*
<i>D. lugubris</i> , 9	0.48 ± 0.003	0.51 ± 0.01*

Здесь и в табл. 2: \* различия достоверны ( $p < 0.05$ ).

**Таблица 2.** Площадь регенерантов в течение недели после операции, условные единицы

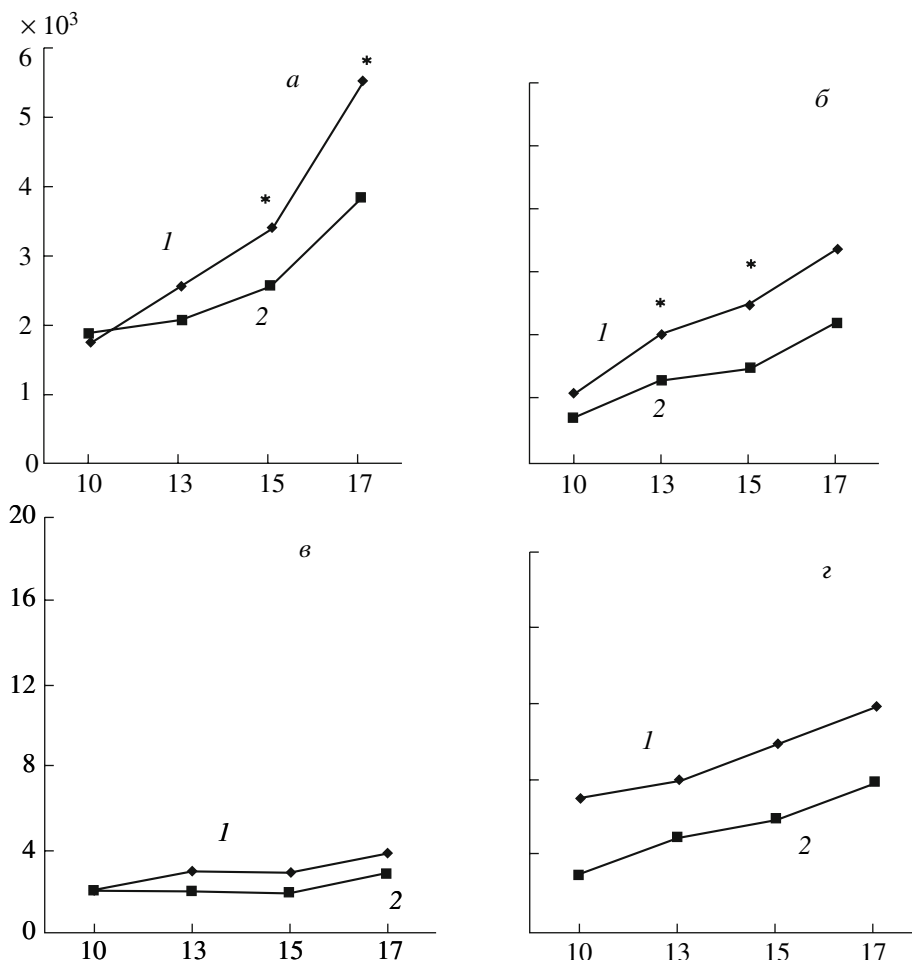
Объект исследования и время содержания в культуре, мес	Время регенерации, сут	Площадь регенерантов у групп с концентрацией ртути	
		низкой	высокой
<i>P. tenuis</i> , 6	10	3472 ± 2.2	3762 ± 2.2*
	13	7734 ± 2.4	4220 ± 2.4*
	15	10371 ± 5.3	5226 ± 5.3*
	17	22228 ± 7.9	11709 ± 7.9*
<i>D. lugubris</i> , 9	10	7357 ± 5.4	2043 ± 5.4*
	13	16104 ± 6.8	6455 ± 6.8*
	15	25160 ± 8.5	9132 ± 8.5*
	17	40956 ± 5.8	15582 ± 5.8*

группах также равноценно увеличивалась в размерах (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Калафатик с соавторами (Kalafatic et al., 2004) изучали влияние хлорида ртути на митотическую активность необластов в процессе регенерации планарии *Polycelis felina*. Нарушения в процессе митоза и хромосомные aberrации были изучены спустя 6 ч после операции и 1 сут восстановительного периода после травмы. Хлорид ртути вызывал зависимое от дозы уменьшение митотической активности необластов, которое сопровождалось нарушением нормальной ориентации веретена деления. Также были отмечены различного рода цитологические аномалии. Все эти явления были обнаружены даже при низких концентрациях этого вещества.

Как показывают наши наблюдения, у обоих видов планарий из обеих групп после операции наступала длительная фаза мышечного сокращения. Задержка начала восстановительных процессов у червей с низкой концентрацией ртутьорганических соединений, вероятно, связана с тем, что с течением времени они накапливали уровни



**Рис. 2.** Рост регенерирующих тканей у планарий *P. tenuis* (а), *D. lugubris* (б) и отношение площади бластемы к площади всего хвостового фрагмента у *P. tenuis* (в) и *D. lugubris* (г).

По оси абсцисс – время после операции, сут; по оси ординат – величина площади тканей в условных единицах (а, б) и отношение площади регенерирующих тканей к площади всего фрагмента тела планарии, % (в, г); \*отличия между вариантами эксперимента статистически достоверны ( $p < 0.05$ ); 1, 2 – планарии с низким и высоким содержанием ртутьорганических соединений соответственно.

металла, превышающие таковые в фарше в 5–50 раз. У животных с высоким содержанием соединений ртути начало формирования бластемы было отмечено в еще более поздние по сравнению с планариями с низким содержанием ртути сроки, что связано с более высокими уровнями накопленных в их организме ртутьорганических соединений.

Бест и соавторы (Best et al., 1981) обнаружили тератогенный эффект метилртути после декапитации планарий. По сравнению с контрольными животными у экспериментальных червей наблюдали задержку в восстановлении головного фрагмента. При этом аурикулярные выросты у таких животных после 10 сут регенерации были все еще в рудиментарном состоянии. На 15-е сут после операции у экспериментальных планарий была отмечена резорбция частично восстановленных голов,

в то время как у контрольных животных регенерация закончилась на 13-е сут после декапитации.

Несмотря на активный абсолютный рост тканей после операции у планарий *Polycelis tenuis*, их относительный рост оказался наименьшим. У планарий этого вида площадь всего регенеранта значительно увеличивалась в размерах.

Наиболее важными этапами формирования регенерационной бластемы оказываются активация свободных клеток паренхимы и их миграция к раневой поверхности (Короткова, 1997). Высокое накопление метилированных соединений ртути в теле планарий может тормозить эти процессы, что подтверждается большей скоростью роста бластемы и тканей у планарий *P. tenuis* и *D. lugubris* с низким содержанием соединений ртути.

Таким образом, ртутьорганические соединения, токсический эффект которых достаточно хорошо изучен на позвоночных животных и чело-

веке (Rodier, 1995), влияют и на течение восстановительных процессов у плоских червей. Это выражается в том, что начало регенерации сдвигается во времени, а интенсивность роста вновь образованных тканей у планарий с высоким содержанием ртуторганических соединений ниже, чем у животных с низким содержанием этих соединений.

Описанный метод может использоваться при изучении степени токсичности различных соединений, в частности и ртуторганических.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Карлсон Б.М. Регенерация. М.: Наука, 1986. 212 с.
- Короткова Г.П. Регенерация животных. СПб.: Изд-во ун-та, 1997. 480 с.
- 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.
- Порфирьева Н.А., Дыганова Р.Я. Планарии Европейской части СССР. Казань: Изд-во ун-та, 1987. 190 с.
- Тирас Х.П., Сахарова Н.Ю. Прижизненная морфометрия регенерации планарий // Онтогенез. 1984. Т. 15. № 1. С. 41–48.
- Токин Б.П. Регенерация и соматический эмбриогенез. Л.: Изд-во ЛГУ, 1959. 268 с.
- Шейман И.М., Крещенко Н.Д., Седелников З.В., Грозный А.В. Морфогенез у планарий *Dugesia tigrina* // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 4. С. 285–290.
- Best J.B., Morita M., Ragin J. et al. Acute toxic responses of the freshwater planarian, *Dugesia dorotocephala* to methylmercury // Bull. Environ. Cotarn. Toxicol. 1981. V. 27. P. 49–54.
- Bloom N.S., Watras C.J., Hurley J.P. Impact of acidification on the methyl mercury cycle of remote seepage lakes // Water Air Soil Poll. 1991. V. 56. P. 477–491.
- Bronsted H.V. Planarian regeneration. Oxford: Braunschweig, 1969. 276 p.
- De Flora S., Bennicelli C., Bagnosco M. Genotoxicity of mercury compounds // Mutat. Res. 1994. V. 317. P. 57–79.
- Fitzgerald W.F. Is mercury increasing in the atmosphere? The need for an atmospheric mercury network (AMNET) // Water Air Soil Poll. 1995. V. 85. P. 245–254.
- Grover P., Banu B.S., Devi K.D. et al. In vivo genotoxic effects of mercuric chloride in rat periphersl blood leukocytes using comet assay // Toxicology. 2001. V. 167. № 3. P. 191–197.
- Kalafatic M., Kopjar N., Besendorfer V. The influence of mtrcuric chloride on neoblast division in regenerating planarian *Polycelis felina* (Daly.) // Water Air Soil Poll. 2004. V. 156. P. 195–210.
- Rodier P.V. Developing brain as a target of toxicity // Environ. Health. Perspect. 1995. V. 103. № 6. P. 73–76.
- Sokal R.R., Rohlf F.J. Biometry. The principals and prctice of statistics in biological research. N.Y.: W.H. Freeman Co., 1995. 887 p.

## Regeneration in Two Freshwater Planarian Species Exposed to Methylmercury Compounds

I. V. Medvedev

*Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Yaroslavl oblast, 152742 Russia*

*e-mail: medigo@ibiw.yaroslavl.ru*

**Abstract**—The regeneration rate was studied by the morphometric method in planarians *Polycelis tenuis* and *Dugesia lugubris* after different periods of exposure on food substrates with high (0.30–0.50 mg/kg wet weight) and low (0.02–0.07 mg/kg) concentration of methylmercury compounds. The planarian growth and the ratio of regenerating tissue area to the total fragment area after transverse cutting were evaluated. The rate of size increment was lower in animals with high level than with low level of methylmercury than with low level of methylmercury. The highest relative and absolute body area increment after amputation was observed in *D. lugubris* and *P. tenuis*, respectively. Thus, natural methylmercury compounds were shown to inhibit tissue regeneration in planarians in a dose-dependent manner.

*Key words:* planarians, regeneration, methylmercury compounds.