

УДК 591.746:591.3:611-013

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЛАНАРИЙ *Girardia tigrina*

© 2009 г. О. Н. Ермакова, А. М. Ермаков, Х. П. Тирас, В. В. Леднев

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

142290 Пущино, Московская обл., ул. Институтская, д. 3

E-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Поступила в редакцию 02.02.09 г.

Окончательный вариант получен 09.04.09 г.

Исследовано влияние мелатонина на регенерацию головной и хвостовой частей планарий *Girardia tigrina*. Оценивали также изменение митотической активности стволовых клеток планарий – необластов – в головной и хвостовой постбластемах под воздействием этого индоламина. Показано, что мелатонин в физиологических концентрациях (10^{-10} – 10^{-5} М) способен ингибировать регенерацию головной части планарий посредством подавления митотической активности необластов. Установлено, что этот гормон не влияет на рост хвостовой бластемы планарий, проявляя таким образом дистопроксимальный эффект воздействия на регенерацию.

Ключевые слова: планарии, регенерация, мелатонин, необласты.

Пресноводные плоские черви планарии (*Platyhelminthes*, *Turbellaria*, *Tricladida*) известны своей уникальной способностью к восстановлению утраченных частей тела путем регенерации. Регенерация этих животных осуществляется за счет пролиферации и дифференцировки стволовых клеток – необластов. Планарии представляют собой удобный объект для проведения фундаментальных исследований в области регенерации, морфогенеза и биологии стволовых клеток (Sanchez Alvarado et al., 2002). Известно, что пролиферация необластов и регенерация контролируются многочисленными как эндогенными, так и экзогенными факторами различной природы. Среди них выделяют особый класс биологически активных веществ, контролирующих процессы развития и роста, которые называются морфогенами. Они могут быть пептидной (морфоген гидры, эндорфины и т.д.) и непептидной природы (серотонин, ретиноиды), а также оказывать стимулирующее или ингибирующее действие на регенерацию планарий (Шейман и др., 1989; Тирас и др., 1996).

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) – индоламин, который синтезируется практически во всех живых организмах, включая бактерии. Он выполняет многочисленные физиологические функции, основные из которых – антиоксидантная защита и регуляция биологических ритмов (Hardeland, Roesgeger, 2003). В теле планарий мелатонин был обнаружен, показана его роль в регуляции бесполого размножения, а также изучен циркадный ритм его биосинтеза в голове этих животных (Morita et al., 1987). При высоких концентрациях (10^{-3} М) мелато-

нин приводит к гибели 50% животных и одновременно ингибирует регенерацию у оставшихся планарий. При этом было зафиксировано подавление регенерации как головного, так и хвостового отделов регенерантов. Снижение концентрации мелатонина до 7×10^{-4} М выявило дистопроксимальную зависимость от мелатонина – специфическое торможение регенерации головного конца тела. Дальнейшее снижение концентрации мелатонина до 10^{-4} М полностью снимало тормозной эффект гормона на регенерацию (Yoshizawa et al., 1991). Таким образом, мелатонин, по-видимому, является морфогенетически активным веществом, оказывающим специфическое влияние на регенерацию планарий. Однако применение высоких (летальных и сублетальных) концентраций этого гормона не позволяет сделать однозначное заключение о его специфическом действии на регенерацию.

Цель нашей работы – исследование проксимодистальной зависимости действия мелатонина в физиологических концентрациях на регенерацию планарий.

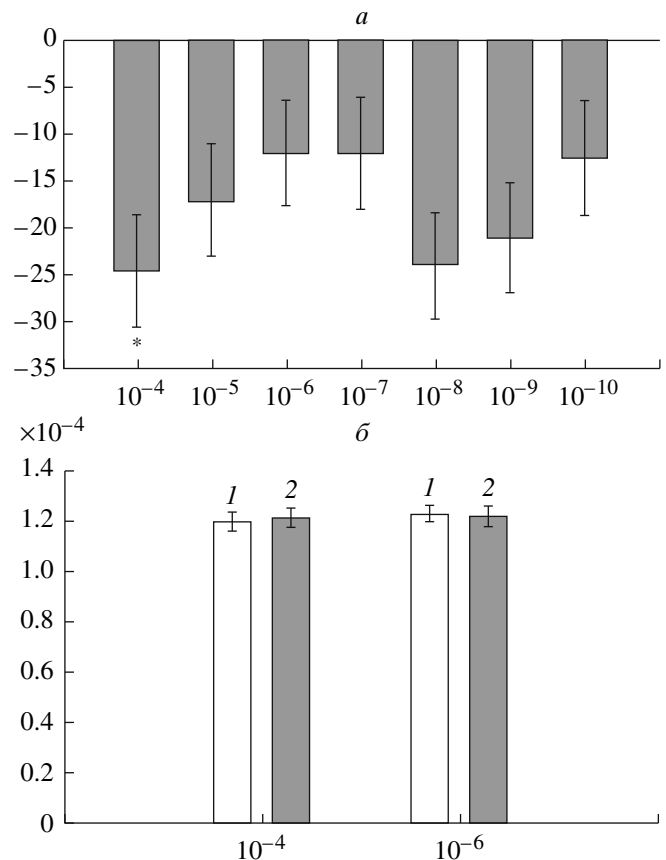
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследование выполнено на бесполой расе пресноводных плоских червей планарий *Girardia tigrina* (Girard, 1850). Животных содержали в прудовой воде при комнатной температуре и кормили раз в неделю личинками двукрылых. Для экспериментов отбирали планарий длиной около 10 мм и прекращали их кормление за 7 сут до опытов. Регенерацию головы вызывали ампутацией 1/5 части

тела планарий, содержащей головной ганглий; хвостовую часть тела ампутировали на расстоянии 1–2 мм от конца тела животного. Мелатонин в растворе этанола добавляли непосредственно после декапитации в стаканы с водой, в которые помещали декапитированных животных. Стоковый раствор мелатонина (2 мг/мл) готовили следующим образом: навеску гормона растворяли в 30 мкл этанола и затем доводили дистиллированной водой до 1 мл. Вода контрольных групп планарий содержала этанол, равный его концентрации в воде опытных групп. Конечные концентрации этанола для планарий во всех группах были нетоксичными. Температуру воды, равную 21°C в экспериментальном и контрольном стаканах, поддерживали с одинаковой с точностью $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Эксперименты каждой серии повторяли не менее трех раз. Статистическую обработку и анализ результатов проводили с помощью программы Sigma-Plot 9.0 (“Systat Software Inc.”, США).

Кинетику роста бластемы в экспериментальных и контрольных группах животных определяли методом прижизненной компьютерной морфометрии, который основан на регистрации фотоконтраста между старыми (пигментированными) и новыми (прозрачными) частями тела планарий (Тирас и др., 1996). Регенерирующих планарий фотографировали под бинокулярной лупой через 72 ч после ампутации. На полученных изображениях определяли площадь всей планарии (S) и площадь прозрачной регенерирующей бластемы (s). Скорость регенерации планарий характеризовали индексом регенерации $R = s/S$. Величину биоэффекта оценивали как относительную разницу R между средними значениями индекса регенерации для контрольных и опытных групп, выраженную в процентах. Каждое из определяемых значений R – результат усреднения измерений по 30 животным как в опыте, так и в контроле. Ошибка в определении R не превышала 3%.

В качестве дополнительного критерия оценки роста бластемы использовали определение митотической активности необластов в постбластеме (в ткани, непосредственно примыкающей к бластеме) путем остановки деления метафазных клеток. Сразу после ампутации у планарий головной или хвостовой частей в среду с животными добавляли колхицин в концентрации 0.05%. Через 24 ч участки постбластемы ампутировали и помещали для диссоциации в раствор, содержащий смесь ледяной уксусной кислоты, 96% этилового спирта, глицерина и воды в соотношении объемов 1 : 3 : 2 : 14. Для выявления метафазных фигур использовали флуоресцентный краситель Hoechst-33342 (“Sigma”, США) в концентрации 1 мкг/мл. На полученных препаратах клеток с помощью микроскопа ЛЮМАМ-2 (“ЛОМО”, Россия) определяли число метафазных фигур на 1000 клеток (митотический индекс, MI). Величину биоэффекта оценивали как относительную разницу ΔMI между средними значениями ми-



Влияние мелатонина на рост головной (а) и хвостовой (б) бластем планарий *G. tigrina*. 1 – контроль, 2 – опыт, * отличия достоверны при $p < 0.001$.

По оси абсцисс – концентрация мелатонина, М. По оси ординат: а – величина эффекта ΔR , % ($\Delta R = \frac{(R_{\text{Э}} - R_{\text{К}}) \pm (m_{\text{Э}} - m_{\text{К}})}{R_{\text{К}}} \times 100\%$, где ΔR – разница между средними величинами индекса регенерации в экспериментальных ($R_{\text{Э}}$) и контрольных ($R_{\text{К}}$) образцах; $m_{\text{Э}}$, $m_{\text{К}}$ – ошибки среднего для измерений в опыте и контроле); б – индекс регенерации $R = s/S$, отн. ед. (см. в тексте).

тотического индекса для контрольных и опытных групп, выраженную в процентах. Каждое экспериментально полученное значение MI является результатом усреднения по 30000 клеток.

тотического индекса для контрольных и опытных групп, выраженную в процентах. Каждое экспериментально полученное значение MI является результатом усреднения по 30000 клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования обнаружено, что мелатонин вызывает ингибирование роста головной бластемы планарий *G. tigrina*. На рисунке приведена концентрационная зависимость влияния изучаемого гормона на регенерацию головы этих животных. Максимальный эффект, равный $-25\% \pm 6\%$, наблюдали при концентрации мелатонина 10^{-4} М. При концентрации мелатонина 10^{-5} М происходит достоверное снижение вызываемого эффекта до

Влияние мелатонина на митотическую активность необластов в головной и хвостовой постбластемах планарий *G. tigrina*

Концентрация мелатонина, М	Митотический индекс $MI \pm m$		Биологический эффект $\Delta MI \pm m_{\Delta MI}^{**}$, %
	контроль	опыт	
	Головная постбластема		
10^{-4}	0.0261 ± 0.0004	0.0133 ± 0.0002	$-49\% \pm 2.3\%^*$
10^{-6}	0.0243 ± 0.0003	0.0170 ± 0.0003	$-30\% \pm 2.5\%^*$
	Хвостовая постбластема		
10^{-4}	0.0122 ± 0.0002	0.0125 ± 0.0001	$2.4\% \pm 2.5\%$
10^{-6}	0.0133 ± 0.0003	0.0136 ± 0.0004	$2.3\% \pm 5.2\%$

Примечания: * различия достоверны при $p < 0.001$; ** $\Delta MI = \frac{(MI_{\text{Э}} - MI_{\text{К}}) \pm (m_{\text{Э}} - m_{\text{К}})}{MI_{\text{К}}} \times 100\%$, где $MI_{\text{Э}}$ и $MI_{\text{К}}$ – средняя величина митотического индекса в экспериментальных и контрольных образцах соответственно, $m_{\text{К}}$, $m_{\text{Э}}$ – ошибки среднего для измерений.

$\Delta R = -19 \pm 6\%$, а при концентрации 10^{-7} М – $\Delta R = -12 \pm 5.5\%$. Уменьшение содержания мелатонина в растворе с регенерирующими планариями до 10^{-8} М вызывало достоверное усиление эффекта ингибирования роста бласты до $-24 \pm 5.4\%$. Дальнейшее снижение концентрации изучаемого гормона приводило к снижению уровня ингибирования роста головной бласты планарий: при концентрации 10^{-9} М ΔR составляло $-21 \pm 6\%$, а при концентрации 10^{-10} М было равно $-12 \pm 5.9\%$.

Таким образом, эффективность ингибирования мелатонином регенерации головы у планарий *G. tigrina* сопровождалась наличием двух концентрационных максимумов биологического эффекта, вероятно, связанного с особенностями физиологической активности изучаемого гормона в организме планарий. Возможно, это обусловлено наличием у этих животных разных мелатониновых рецепторов, имеющих различные константы связывания с лигандом и соответственно проявляющих максимальную активность при разных концентрациях мелатонина.

Одновременно с исследованием влияния мелатонина на регенерацию головы у планарий мы провели анализ митотической активности необластов в головной постбластеме. Приведенные результаты (таблица) показывают, что добавление в среду мелатонина в концентрации 10^{-6} М сопровождалось достоверным снижением уровня пролиферации необластов на $50 \pm 3\%$. Они также указывают на то, что при воздействии мелатонина на планарий замедление уровня роста головной бласты реализуется посредством подавления этим гормоном митотической активности стволовых клеток – необластов. Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными на культурах клеток высших животных, где мелатонин вызывал торможение пролиферации клеток путем ареста клеточного цикла (Cos et al., 1991). Наряду с ингибирующим

действием на пролиферацию необластов мелатонин в высоких концентрациях, возможно, способен физиологически индуцировать программируемую гибель стволовых клеток – апоптоз. Подобный эффект этот гормон вызывает при воздействии *in vitro* на активно пролиферирующие раковые клетки млекопитающих (Anisimov et al., 2000).

Общая схема воздействия мелатонина на регенерирующих планарий может выглядеть следующим образом: в высоких концентрациях мелатонин вызывает программируемую гибель необластов, а в более низких ($\leq 10^{-6}$ М) – тормозит их пролиферацию.

Проведенные исследования по влиянию мелатонина на регенерацию хвостовой части планарий *G. tigrina* (рисунок) показали, что этот гормон даже в достаточно высоких концентрациях (10^{-4} М) не приводил к замедлению роста хвостовой бласты. Изучение митотической активности необластов под воздействием мелатонина в хвостовой постбластеме планарий (таблица) также не выявило достоверных отличий между опытными и контрольными группами.

Таким образом, мелатонин обладает дистопроксимальным эффектом воздействия на регенерацию планарий. Подобные эффекты можно объяснить градиентами распределения в теле планарий рецепторов мелатонина или же ферментов, участвующих в его метаболизме. Так, например, было показано, что максимальное содержание эндогенного мелатонина наблюдается в головной, а минимальное – в хвостовой части планарий (Yoshizawa et al., 1991). Сходный дистопроксимальный эффект наблюдался при воздействии морфогена гидры на регенерацию головной и хвостовой частей планарий (Тирас и др., 1989).

Полученные данные позволяют предположить, что мелатонин в теле планарий выступает в роли не

только регулятора биологических ритмов, но и важного морфогена, контролирующего процессы пролиферации необластов и регенерацию.

В результате наших исследований можно сделать следующие выводы.

1. Мелатонин в физиологических концентрациях (10^{-10} – 10^{-5} М) вызывает ингибирование регенерации головы планарий, причем уровень подавления регенерации зависит от концентрации действующего вещества и имеет нелинейный характер.

2. Ингибирование мелатонином роста головной бластемы планарий реализуется посредством подавления этим гормоном митотической активности стволовых клеток планарий – необластов.

3. Мелатонин не влияет на регенерацию хвостовой части планарий (дистопроксимальный эффект), что указывает на роль этого гормона в регуляции морфогенеза.

Полученные данные позволяют предположить, что в организме планарий мелатонин выступает в роли не только регулятора биологических ритмов, но и важного морфогена, участвующего в контроле процессами пролиферации необластов и посттравматической регенерации. Кроме того, мелатонин выявляет особенности пролиферации и дифференцировки исходно равноценных резервных клеток планарий в зависимости от восприятия ими позиционной информации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Тирас Х.П., Рубина А.Ю., Милосердов Ю.В. и др.* Морфоген гидры – возможный эндогенный регулятор регенерации планарий // Морфогенетически активные вещества. Пушкино: ПНЦ АН СССР, 1989. С. 134–145.
- Тирас Х.П., Сребницкая Л.К., Ильасова Е.Н. и др.* Влияние слабого комбинированного магнитного поля на скорость регенерации планарий *Dugesia tigrina* // Биофизика. 1996. № 40. № 4. С. 826–831.
- Шейман И.М., Тирас Х.П., Балобанова Э.Ф.* Морфогенетическая функция нейропептидов // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова СССР. 1989. Т. 75. Вып. 5. С. 619–626.
- Anisimov V.N., Popovich I.G., Shtylik A.V. et al.* Melatonin and colon carcinogenesis. III. Effect of melatonin on proliferative activity and apoptosis in colon mucosa and colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats // Exp. Toxicol. Pathol. 2000. V. 52. P. 71–76.
- Cos S., Blask D.E., Lemus-Wilson A. et al.* Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and “estrogen-rescue” of MCF-7 human breast cancer cells in culture // J. Pineal Res. 1991. V. 10. P. 36–42.
- Hardeland R., Poeggeler B.* Non-vertebrate melatonin // Ibid. 2003. V. 34. P. 233–241.
- Morita M., Hall F., Best J.B. et al.* Photoperiodic modulation of cephalic melatonin in planarians // J. Exp. Zool. 1987. V. 214. P. 383–388.
- Sanchez Alvarado A., Newmark P.A., Robb S.M. et al.* The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration // Development. 2002. V. 129. P. 5659–5665.
- Yoshizawa Y., Wakabayashi K., Shinozawa T.* Inhibition of planarian regeneration by melatonin // Hydrobiologia. 1991. V. 227. P. 31–40.

Melatonin Effect on the Regeneration of the Flatworm *Girardia tigrina*

O. N. Yermakova, A. M. Yermakov, Kh. P. Tiras, V. V. Lednev †

The Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Puschino, Russia
Email: ao_ermakovy@rambler.ru

Abstract—The melatonin effect on the anterior and posterior ends of a free-living flatworm *Girardia tigrina* was studied, as well as the variability of the mitotic activity of the stem cells (neoblasts) in the anterior and posterior postblasteme. This hormone may inhibit the regeneration of the anterior end of the animal in the physiologic-friendly concentrations of 10^{-10} – 10^{-15} M by suppressing the mitotic activity of the neoblasts. This hormone does not affect the posterior end’s regeneration; thus, its regeneration effect is significantly elective.

Key words: flatworms, regeneration, melatonin, neoblasts.