

УДК 591

ПРОЦЕСС РЕГЕНЕРАЦИИ У ПЛАНАРИЙ РАЗНЫХ ВИДОВ<sup>1</sup>© 2010 г. И. М. Шейман, Н. Д. Крещенко, М. В. Нетреб\*<sup>\*</sup>

Институт биофизики клетки РАН

\*Пушчинский государственный университет

142290 Пушкино, Московская область

E-mail: sheiman@icb.psn.ru

Поступила в редакцию 14.03.09 г.

Окончательный вариант получен 05.05.09 г.

Сравнивали рост бластемы и функциональное созревание глотки у планарий разных видов в ходе регенерации. Интенсивность роста бластемы была наибольшей у *Polycelis tenuis*, наименьшей – у *Schmidtea mediterranea*. У планарий *Girardia tigrina* половой и бесполой рас характер роста бластем различался мало. Функция глотки в ходе регенерации хвостовых фрагментов, лишенных глотки, проявлялась у *G. tigrina* в обычные сроки и в более ранний период – при регенерации в лишенных глотки головных фрагментах. У планарий других двух видов сроки регенерации глотки не имели закономерного характера и были растянуты по сравнению с этим же процессом у *G. tigrina*.

*Ключевые слова:* планарии, регенерация, бластема, глотка, пищевое поведение.

Способность планарий к регенерации привлекает к ним повышенный интерес. Интенсивные исследования в разные периоды времени обогащали знания новыми данными о процессах морфогенеза, поведении клеток и регуляторных процессах. Авторы исследований обычно указывали видовую принадлежность экспериментального объекта, но полученные результаты принято было обобщать, приписывая их всем видам планарий. Между тем для оценки полученных фактов существенно знать, универсальны ли они для восстановительных процессов или характерны только для отдельных таксономических групп. Так, известно, что не все виды планарий способны к регенерации, не регенерируют, например, молочно-белая планария и некоторые байкальские эндемики (по наблюдениям одного из авторов). Кроме того, не всегда регенерация сопровождается образованием бластемы (Nentvig, 1978). Об источниках регенерации глотки у планарий существуют спорные мнения (Крещенко, 2009). Морфогенетическая пластичность планарий проявляется не только в регенерации, но и в процессах жизнедеятельности (Шейман, 1984). Все эти сведения послужили предпосылкой для проведения сравнительного анализа морфогенеза в процессе регенерации наиболее часто используемых в качестве объектов видов планарий.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работу выполнили на четырех видах пресноводных планарий: два вида *Girardia tigrina* (бесполовая лабораторная и природная половая расы) и *Schmidtea mediterranea* (бесполовая раса), относящиеся к семейству Dugesidae, и *Polycelis tenuis* (половые) семейства Polycelis. Три вида из них – двуглазые, а *P. tenuis* – многоглазая (рис. 1). Всех содержали в сосудах со смесью водопроводной и дистиллированной воды (2 : 1) в полутемных условиях при температуре 19–21°C, в этих же условиях проводили опыты. Планарий кормили два раза в неделю дождевыми червями.

Регенерацию животных характеризовали с помощью морфологических и функциональных показателей. У перерезанных планарий измеряли площадь отрастающей регенерационной бластемы методом компьютерной морфометрии (Шейман и др., 2004). Функциональным показателем являлось появление пищевой реакции глотки (Крещенко, 1993) в процессе ее регенерации у фрагментов перерезанных планарий. Операции перерезки проводили впереди или позади глотки. Группе планарий предъявляли пищу и устанавливали долю регенератов, поевших и увеличившихся в объеме в последовательные дни после операции. Опыты проводили одновременно в группах из 30 планарий и повторяли до трех раз.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамику роста регенерационной бластемы изучали в трех опытах, проводившихся одновременно на четырех видах планарий. В каждом из них оперировали по 30 червей, у которых отрезали примерно

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 09-04-00243а, 08-04-00271а, 07-04-00452а).

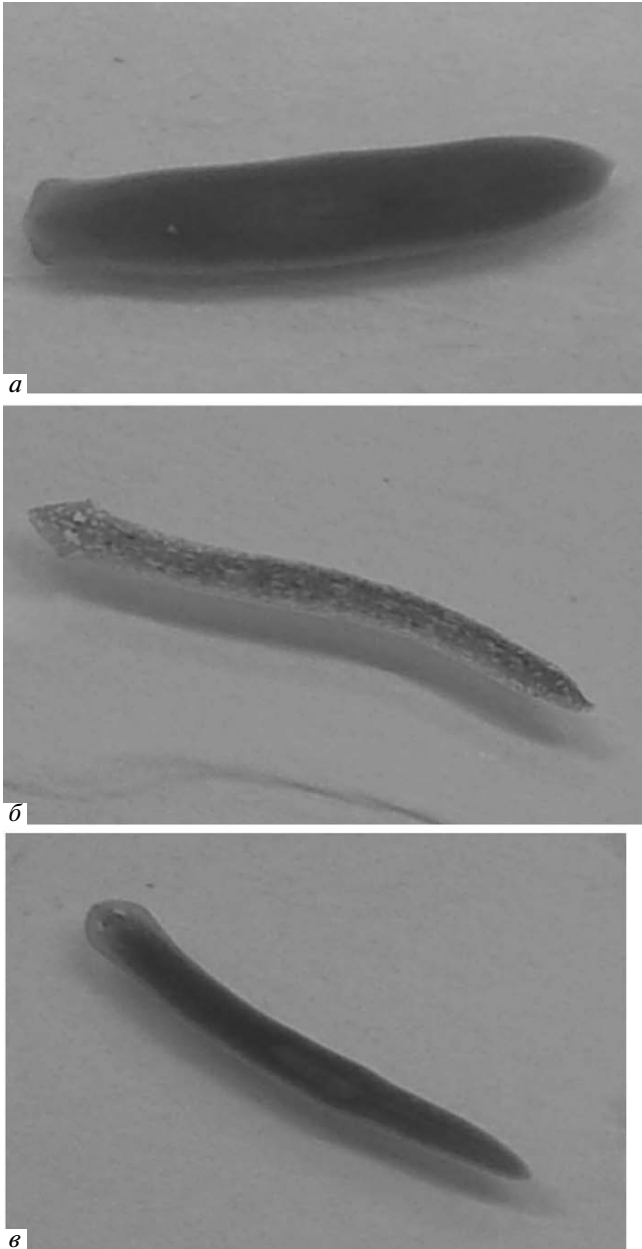


Рис. 1. Внешний вид планарий: а – *Polycelis tenuis*; б – *Girardia tigrina*; в – *Schmidtea mediterranea*.

1/5 передней части тела, а затем измеряли площадь головных blastem у хвостовых фрагментов. Съемку регенератов производили на 3, 5, 7 и 10-е сут после операции, т.е. в ходе первого этапа регенерации. Этот период характеризуется наиболее интенсивными процессами роста и развития структур blastемы планарий (Шейман, 1984). Результаты морфометрирования blastем в трех опытах были близки. Данные одного опыта, иллюстрирующие изменения средней площади головных blastем на регенерирующих хвостовых фрагментах представлены на рис. 2.

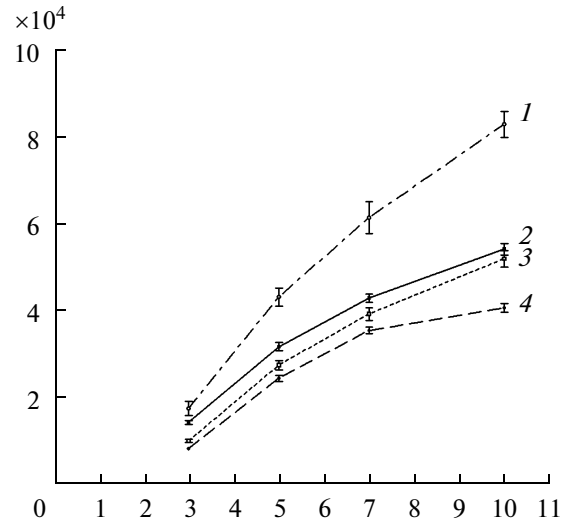


Рис. 2. Динамика роста головной blastемы при регенерации у разных видов планарий: 1 – *Polycelis tenuis*; 2, 3 – *Girardia tigrina* (бесполовая и половая расы соответственно); 4 – *Schmidtea mediterranea*.

По оси абсцисс – время регенерации, сут; по оси ординат – средняя величина площади blastемы, усл. ед.

Различия достоверны во всех точках между всеми видами планарий (*t*-критерий Стьюдента); различия между *P. tenuis* и *G. tigrina*:  $p = 0.0544$  в первой точке,  $p < 0.001$  – во всех последующих точках; между половой и бесполой расами *G. tigrina*:  $p < 0.001$  в первой точке,  $p = 0.3459$  – в последней; между *G. tigrina* и *S. mediterranea*:  $p < 0.001$  во всех точках.

Первоначально величина blastемы была близка для всех исследованных видов, однако при последующих измерениях их площади стали различаться, что свидетельствует о разной интенсивности роста. Небольшая разница в площади blastем между разными видами планарий была заметна уже на 3-и сут регенерации, и в дальнейшем рост blastем у планарий разных видов происходил неодинаково. Для характеристики интенсивности роста blastем в качестве дополнительного показателя использовали величину угла, образуемого на рис. 2 между осью абсцисс и отрезком кривой динамики роста blastемы до каждой последующей точки измерения. В табл. 1 приведены величины углов для всех измерений по всем группам планарий. Наибольшей оказалась интенсивность роста blastемы у *P. tenuis*, наименьшей – у *S. mediterranea*, а у обеих рас *G. tigrina* она была почти одинаковой и занимала промежуточное положение. По ходу опытов интенсивность роста blastемы продолжала увеличиваться в том же порядке, а затем постепенно уменьшалась. У *P. tenuis* на протяжении всех измерений сохранялась наиболее высокая скорость роста blastемы, а у остальных планарий она изменялась почти одинаково, постепенно убывая. Наиболее резко она уменьшалась у *S. mediterranea* после 7-х сут регенерации.

У головных фрагментов площадь регенерационных blastем измеряли так же, и так же, как и у хво-

**Таблица 1.** Интенсивность роста blastem у разных видов планарий, выраженная в величине угла (см. в тексте)

Планарии	Величина угла между точками*, °			
	0–1	1–2	1–3	1–4
<i>G. tigrina</i> , бесполовая раса	24	30	29	26
<i>G. tigrina</i> , половая раса	17	22	22	25
<i>S. mediterranea</i>	13	24	25	21
<i>P. tenuis</i>	29	39	39	37

Примечание: \* точки соответствуют 3, 5, 7 и 10-м сут регенерации (см. рис. 2).

стовых фрагментов, наибольшая интенсивность роста blastемы была у планарий *P. tenuis*, а наименьшая – у *S. mediterranea*.

*Динамика восстановления функции глотки* служила показателем ее регенерации. Функция глотки выражается в проявлении пищевой реакции планарий. Были проведены два варианта операций на всех видах: 1) животных перерезали перед глоткой, хвостовые фрагменты сохраняли старую глотку, а головные были ее лишены, 2) разрез проводили позади глотки, сохраняя ее только в головных фрагментах. Для тестирования пищевой реакции глотки все регенераты ежедневно получали доступ к пище, которую убирала спустя 1 ч. Поевших планарий удаляли из сосудов с регенератами и регистрировали их число. Кроме того, сравнивали проявления пищевой реакции в ходе регенерации глотки. В качестве контроля служили интактных планарий и фрагментов регенерирующих планарий, у которых глотка после перерезки сохранялась. Проявление функции глотки у всех исследованных объектов варьировало по времени, а ее восстановление происходило с разной динамикой.

Восстановление функции регенерирующей глотки у всех фрагментов, лишенных ее при операции, происходило по-разному: у *G. tigrina* обеих рас глотка начинала функционировать на 8–9-е сут регенерации в обоих фрагментах; у головных фрагментов *S. mediterranea* – на 1 сут раньше и, напротив, позже у хвостовых фрагментов. У *P. tenuis* при схожем с

предыдущими видами времени начала функционирования глотки восстановление ее у всех регенератов было наиболее длительным. При этом и у головных, и у хвостовых фрагментов, лишенных глотки, восстановление пищевой реакции происходило в одинаковые сроки (табл. 2; рис. 3, а, б).

В контрольных группах у всех головных фрагментов, содержащих глотку, пищевая реакция сохранялась и проявлялась на следующие после операции сутки точно так же, как и у интактных планарий. У хвостовых фрагментов, содержащих глотку, проявление пищевой реакции запаздывало по сравнению с головными фрагментами и растягивалось по времени. Раньше других реакция проявлялась у *S. mediterranea* и *P. tenuis*, у *G. tigrina* обеих рас – позднее и восстанавливалась в компактные сроки. Окончательное восстановление пищевой реакции у всех фрагментов происходило после 5 сут регенерации (рис. 3, в).

Таким образом, функция глотки у *P. tenuis* восстанавливалась в растянутые сроки как при регенерации самой глотки в любом из двух фрагментов, так и при ее сохранении в хвостовом фрагменте и при регенерации у него недостающей головной части. Во втором варианте интактная глотка начинала функционировать раньше, чем регенерирующая, но восстанавливала ее функцию в более длительные сроки. У *S. mediterranea* в хвостовых фрагментах как при наличии, так и в отсутствие глотки восстановление пищевой реакции происходило так же, как у *P. tenuis*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

У планарий разных видов существуют различия в структурной организации тела, например, в нервной системе варьирует форма ганглий и число продольных стволов. У исследованных в нашей работе видов планарий представители семейства Dugesidae имеют ганглий в форме подковы и одну пару мозговых глаз, а представители рода *Polycelis* – ганглий в форме бабочки и большое число краевых глаз по краям тела. Между этими видами планарий есть также функциональные различия пищеварения, а также ацетилхолинэстеразной активности нервной системы (Тирас, 1978; Sakharova, Sheiman, 1977).

**Таблица 2.** Сроки восстановления пищевой реакции при регенерации глотки у планарий в различных фрагментах, сут

Планарии	Головной без глотки		Хвостовой без глотки		Хвостовой с глоткой	
	начало	конец	начало	конец	начало	конец
<i>G. tigrina</i> , бесполовая раса	9	10	9	10	6	8
<i>G. tigrina</i> , половая раса	9	12	8	10	5	8
<i>S. mediterranea</i>	8	10	10	13	3	8
<i>P. tenuis</i>	8	14	8	14	1	6

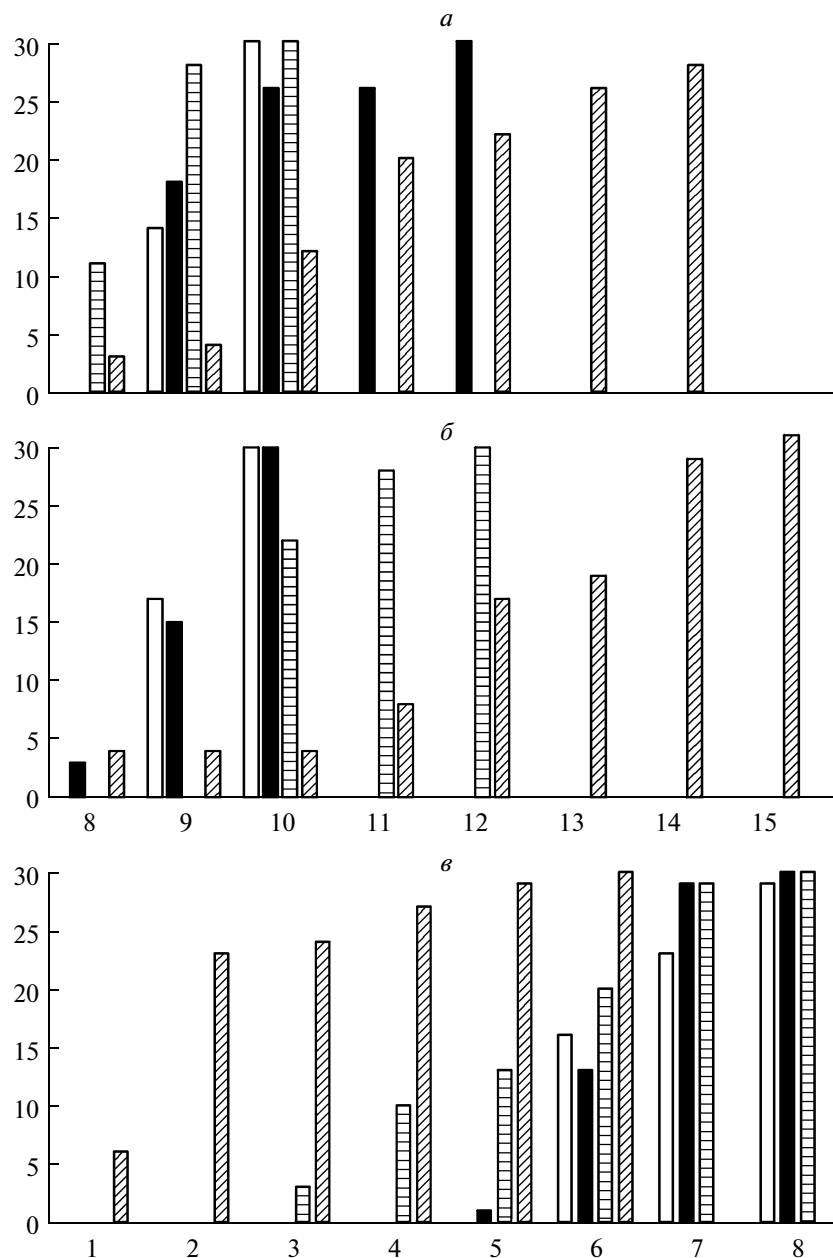


Рис. 3. Динамика восстановления функции глотки в группах регенератов разных видов планарий: а – головной фрагмент без глотки; б – хвостовой фрагмент без глотки; в – хвостовой фрагмент с глоткой.

Планарии: (□, ■) – бесполовая и половая расы *G. tigrina* соответственно; (▨) – *S. mediterranea*; (▩) – *P. tenuis*. По оси абсцисс – время регенерации, сут; по оси ординат – число регенератов.

Мы попытались узнать, существуют ли видовые отличия в процессах морфогенеза у планарий, используя для этого сравнительный анализ регенерации четырех видов тех же двух семейств. Для этого изучили динамику восстановления головного конца тела после его удаления, а также восстановление глотки у фрагментов тела, лишенных ее, после перерезки. Сравнивали показатели роста бластем у фрагментов, перерезанных поперек планарий, и физиологический показатель созревания функции регене-

рирующей глотки. Анализу был подвергнут первый этап регенерации, когда происходит функциональное восстановление структуры, в то время как размеры и пропорции как глотки, так и тела продолжают постепенно восстанавливаться (Шейман, 1984; Крещенко, 1993).

По данным, характеризующим рост регенерационных бластем у разных видов планарий, выделяются *P. tenuis*, у которых и величина бластем, и интенсивность их роста были больше, чем у остальных ви-

дов планарий. Это относилось в равной степени и к головным, и к хвостовым бластемам. При этом размеры головных бластем превосходили хвостовые у всех планарий, что было ранее установлено на бесполой расе *Dugesia* (синоним *Girardia*) *tigrina* (Шейман и др., 2004). В какой степени указанное отличие связано с морфологическими особенностями данного вида планарий, определить пока сложно. Планарии *P. tenuis* отличаются многоглазостью, а также половым способом размножения. Связано ли отличие в интенсивности регенерации у этого вида планарий с необходимостью восстанавливать большое число глаз, утверждать невозможно, тем более что их восстановление происходит постепенно в течение длительного срока (Шейман, Седельников, 2007). На первом этапе роста бластемы появляются только первые глаза, что уравнивает этот вид с двуглазыми планариями. Возможно, при регенерации глаз течение морфогенетического процесса в бластеме имеет свои особые параметры. Среди остальных трех видов планарий выделяется *S. mediterranea*, у которой отмечена самая малая интенсивность роста бластемы.

При регенерации глотки у четырех видов планарий обнаружили как сходные черты, так и видовые особенности. При наличии глотки в головных фрагментах всех видов планарий никаких нарушений пищевой реакции не отмечалось. Проявление пищевого поведения у хвостовых фрагментов с сохраненной глоткой отличалось от такового у фрагментов, лишенных глотки, всех четырех видов планарий. Восстановление пищевой реакции у лишенных глотки головных и хвостовых фрагментов *G. tigrina* половой и бесполой рас и у *S. mediterranea* происходило в близкие сроки и примерно с одинаковой динамикой. У *P. tenuis* функция глотки восстанавливалась позднее, чем у других планарий, хотя интенсивность роста головной бластемы была наибольшей. У других видов планарий глотка также регенерировала медленнее, чем головной конец тела. Очевидно, у всех планарий функция глотки восстанавливалась только после того как формировался остов нового ганглия и к 5-м сут проявлялось его функциональное созревание (Богоровская, 1969; Шейман, 1984). Контрольные опыты показали, что функция интактной глотки после перерезки планарий полностью сохранялась в головных фрагментах всех видов, у которых головной ганглий сохранялся, но нарушалась в хвостовых фрагментах, у которых ганглий был удален, а глотка при перерезке оставалась неповрежденной. Из этого следует, что как интактной, так и регенерирующей глотке для проявления пищевой функции требуется наличие восстановленного головного ганглия. При этом функция интактной глотки в хвостовых фрагментах проявлялась в разные сроки: самые короткие отмечали у *P. tenuis*, затем — у *S. mediterranea* и самые длинные — у *G. tigrina*. Для *P. tenuis* характерно отсутствие постоянных сроков восстановления функции глотки как при ее ре-

генерации, так и при целостности у хвостовых фрагментов. Растянутые сроки восстановления функции глотки свойственны также *S. mediterranea*. В то же время у последних двух видов не проявляется строгая зависимость этой функции от головного ганглия, она, по-видимому, проявляется неодинаково у разных видов планарий и осуществляется наряду с морфологическими отличиями их нервной системы.

Сравнение функции глотки при ее регенерации у разных видов планарий показывает, что между двумя расами *G. tigrina* видимых отличий нет. По срокам восстановления этой функции в головных фрагментах к ним приближается *S. mediterranea*, но значительно отличается *P. tenuis*. По восстановлению же функции глотки в хвостовых фрагментах *S. mediterranea* близка *P. tenuis*, причем это относится и к восстановлению функции интактной глотки в хвостовых фрагментах этих двух видов планарий.

Различия между планариями разных видов по интенсивности роста бластемы и регенерации глотки не совпадают, следовательно, у разных видов планарий для этих процессов характерны специфические свойства. Приведенные данные позволяют увидеть соответствие между процессами морфогенеза разных видов планарий и их таксономическим статусом. Этот вывод противоречит более раннему, сделанному на основе изучения других видов планарий с помощью других методов (Тирас, Сахарова, 1984). Для более основательного утверждения такой связи необходимо проведение углубленного анализа процессов морфогенеза у представителей разных видов планарий и их сравнение.

Мы не встречали в литературе сравнительных исследований проявления одних и тех же функций у разных видов планарий. Однако разные исследователи использовали разные объекты для одинаковых целей. Так, Морган (Morgan, 1901) обнаружил, что у *Planaria maculata* регенерация новой глотки происходит в передних фрагментах тела внутри новой ткани, а в задних фрагментах — в старой ткани. Санже (Sengel, 1959) и Вольф (Wolff, 1962) показали, что у *Dugesia lugubris* и *Polycelis nigra*, у которых отсекали передний и хвостовой фрагменты, глотка регенерировала в старых тканях передних фрагментов, а в хвостовых она формировалась в бластеме и только после дифференцировки мозга. Зиллер (Ziller, 1973), напротив, установила, что у *Dugesia gonocephala* в хвостовых фрагментах новая глотка формировалась в старых тканях, а в передних половинках новая глотка регенерировала в бластеме.

В работе Нентвиг (Nentvig, 1978) на *D. dorotocephala* утверждается, что при регенерации хвостового фрагмента после перерезки планарии образуется регенерационная бластема, в то время как при регенерации после отделения хвостового фрагмента она не возникает. В нашей работе (Шейман и др., 2004) на *D. (Girardia) tigrina* показано, что бластемы

формируются при соблюдении обоих условий, но такие бластемы растут с разной скоростью.

Деление планарий, по данным, полученным нами на *D. tigrina* (Шейман, 1984), нарушается после удаления у них головного конца с ганглием и восстанавливается после регенерации ганглия, а по другим данным, полученным Бестом с сотрудниками на *D. dorochocephala* (Best et al., 1974), ганглий задерживает деление планарий и оно восстанавливается после его удаления.

Повышенный интерес к использованию планарий в качестве экспериментальных объектов, нацеленный на исследования стволовых клеток и создание генетических баз данных, требует особой осторожности при обобщенном подходе к получаемым на разных видах результатам.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Богоровская Г.И. Регенерация нервной системы планарий // Цитология. 1969. Т. 11. № 8. С. 964–972.
- Крещенко Н.Д. Регенерация глотки у планарий *Dugesia tigrina* // Онтогенез. 1993. Т. 24. № 1. С. 66–71.
- Крещенко Н.Д. Регенерация глотки у планарий // Там же. 2009. Т. 40. № 1. С. 3–18.
- Тирас Х.П. Активность ацетилхолинэстеразы в нервной системе планарий в норме и при регенерации // Там же. 1978. Т. 9. № 3. С. 262–267.
- Тирас Х.П., Сахарова Н.Ю. Прижизненная морфометрия регенерации планарий // Там же. 1984. Т. 15. № 1. С. 41–48.
- Шейман И.М. Регуляторы морфогенеза и их адаптивная роль. М.: Наука, 1984. 174 с.
- Шейман И.М., Седельников З.В. Особенности регенерации глаз у многоглазых планарий *Polycelis tenuis* // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 3. С. 228–234.
- Шейман И.М., Седельников З.В., Крещенко Н.Д. и др. Морфогенез у планарий *Dugesia tigrina* // Там же. 2004. Т. 35. № 4. С. 285–291.
- Best J.B., Howell W., Riegel V. et al. Cephalic mechanism for social control of fissioning in planarians. Feedback cue and switching characteristics // J. Neurobiol. 1974. V. 5. P. 421–442.
- Morgan T.H. Regeneration. L.: MacMillan Co., 1901. 293 p.
- Nentvig M.E. Comparative morphological studies of head development after decapitation and after fission in the planarian *Dugesia dorochocephala* // Trans. Am. Microsc. Soc. 1978. V. 50. P. 553–561.
- Sakharova N.Yu., Sheiman I.M. The propagation of food particles in the planarian body // Comp. Biochem. Physiol. A. 1977. V. 58. P. 427–431.
- Sengel C. La region caudale d'une planaire est-elle capable d'induire la regeneration d'un pharynx? // J. Embriol. Exp. Morphol. 1959. V. 7. № 1. P. 73–85.
- Wolff E. Recent researches on the regeneration of planaria // Regeneration. N.Y.: Ronald Press, 1962. P. 53–84.
- Ziller C. La regeneration du pharynx chez la planaire *Dugesia tigrina* // C.R. Acad. Sci. Paris. D. 1973. V. 277. P. 1365–1368.

## Regeneration Processes in Various Species of Planarians

I. M. Sheiman<sup>a</sup>, N. D. Kreshchenko<sup>a</sup>, and M. V. Netreba<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

<sup>b</sup> Pushchino State University, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

e-mail: sheiman@icb.psn.ru

**Abstract**—Blastema growth and functional maturation of the pharynx during regeneration in various planarian species were compared. The intensity of blastema growth was highest in *Polycelis tenuis*; the lowest, in *Schmidtea mediterranea*. In the sexual and asexual races of *Girardia tigrina* blastema growth differed considerably. The function of the pharynx during the regeneration of caudal fragments lacking pharynx was manifested in *G. tigrina* in the usual amount of time, while in the regeneration of head fragments lacking pharynx, this function occurred earlier. In other planarian species of the other two types, the times of pharynx regeneration had no regular character and took longer compared to the same process in *G. tigrina*.

**Key words:** planarians, regeneration, blastema, pharynx, feeding behavior