

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПЛАНАРИЙ *Schmidtea mediterranea*

© 2024 г. Г.В. Кузнецов*, Д.Е. Митьковский**, Н.Д. Крещенко*,#

*Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», ул. Институтская, 3, Пушкино, Московская обл., 142290, Россия

#E-mail: nkreshch@rambler.ru

**Серпуховский колледж, ул. Центральная, 154, Серпухов, Московская область, 142207, Россия

Поступила в редакцию 10.08.2023 г.

После доработки 22.11.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

Нервная система планарий представлена головным ганглием в переднем отделе тела и парой хорошо выраженных брюшных нервных стволов, простирающихся вдоль всего тела животного. Серотонинергические компоненты нервной системы определяли непрямым иммуоцитохимическим методом окраски тотальных препаратов тканей планарий *Schmidtea mediterranea* с последующим анализом с помощью флуоресцентного микроскопа. Присутствие серотонинергических компонентов было обнаружено в центральных и периферических отделах нервной системы планарий *S. mediterranea*. Проведены измерения морфологических параметров серотонин-иммунопозитивных структур, а также подсчет числа нейронов в головном ганглии. Измерения проводили на микрографиях, полученных с окрашенных тотальных препаратов с помощью цифровой фотокамеры. Учитывали размер серотониновых нейронов в трех областях тела, толщину нервных стволов и головного ганглия, расстояние между нервными стволами и комиссурами. Впервые получены новые количественные данные, характеризующие морфологические свойства нервной системы планарий *S. mediterranea*. Также наблюдали за регенерацией глаз планарий после декапитации и воздействия серотонином. Обнаружено, что экзогенный серотонин в концентрации 0.01–1.00 мкМ ускорял дифференцировку глаз в ходе регенерации головного конца планарий *S. mediterranea*.

Ключевые слова: флуоресцентная микроскопия, планарии, нервная система, серотонин, морфометрия, регенерация.

DOI: 10.31857/S0006302924010081, EDN: RCZGGL

Плоские черви (тип Platyhelminthes) представляют собой процветающую группу животных, у которых впервые появляется билатеральная симметрия и происходит централизация нервной системы. Изучение паразитических плоских червей, вызывающих опасные заболевания человека и сельскохозяйственных животных, чрезвычайно важно с медицинской и экономической точки зрения. Свободноживущие же представители плоских червей — планарии (класс Turbellaria) давно используются в качестве модельного биологического объекта при изучении процессов регенерации, биологии стволовых клеток, развития и эволюции нервной системы, и механизмов мышечного сокращения [1–6]. Геном планарий *Schmidtea mediterranea* секвенирован [7], что позволяет ученым проводить большинство молекулярно-биологических исследований с использованием данного вида [8, 9].

Микроскопические и ультраструктурные исследования выявили, что нервная система у представителей плоских червей ортогонального типа: она состоит из головных нервных ганглиев и трех пар продольных нервных стволов — дорсальных, брюшных и латеральных, соединенных между собой поперечными нервными комиссурами [10–12]. Клетки ортогона содержат главным образом двигательные и ассоциативные нейроны. Парный головной ганглий называется эндоном. Он представлен нейропилем — внутренней частью, состоящей из нервных отростков, и окружающим его скоплением нервных клеток (тел нейронов). Нейропиль состоит из тонких немиелинизированных отростков нервных клеток, которые тесно прилегают друг к другу, тела нейронов головного ганглия, как правило, расположены на его периферии [13, 14]. Брюшные нервные стволы образованы скоплениями нервных клеток и нервных волокон.

У планарий в передней части тела имеется головной ганглий и пара хорошо выраженных продольных брюшных нервных стволов. Планарии обладают и развитой периферической нервной системой, состоящей из субэпителиального и субмышечного нервных плексусов, а также глоточной нервной сетью и сетью, обеспечивающей иннервацию репродуктивных органов у видов, размножающихся половым путем [15]. Субэпителиальная нервная сеть представляет собой скопления чувствительных клеток со свободными нервными окончаниями [16]. Ранее при изучении морфологии нервной системы была показана большая гетерогенность популяции нервных клеток, связанная с размером и плотностью секретируемых ими везикул, и структурой синапсов нейронов. Так, в проведенном ультраструктурном исследовании [17, 18] было обнаружено, что нейроны планарий подразделяются на три основных типа. Наиболее распространен тип нейронов, содержащих плотные везикулы, они могут быть уни-, би- и мультиполярными. Второй тип — пептидэргические нейроны, содержащие большие везикулы, это уни- и биполярные нейроны. Третий тип — сенсорные нейроны, обычно биполярные.

Нервные клетки планарий при отсутствии у этих животных настоящей эндокринной системы обладают способностью к нейросекреции [17, 19–21]. С помощью ряда радиоиммунологических, гистохимических и ультраструктурных методов в нейронах планарий обнаружено присутствие классических нейротрансмиттеров, характерных для высших многоклеточных. В нервной системе планарий описана ацетилхолинэстеразная активность (у *Dugesia lugubris*, *Bdellocephala punctata*, *Planaria torva* [22] и *Provortex karlingi* [23]), показано присутствие ацетилхолина у *Procotyla fluviatilis* [24] и *Planaria torva* [25]. Катехоламины — дофамин и норадреналин — были идентифицированы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в экстракте тканей планарий *Dugesia tigrina*, *P. fluviatilis* и *Phagocata oregonensis* [26], а также у некоторых других турбеллярий [27, 28]. Гистамин-положительные клетки наблюдали в нервной системе *Polycelis nigra* и *Microstomum lineare* [29]. В нервных волокнах и клетках глоточной нервной системы планарий *D. tigrina* выявлен оксид азота [30]. Присутствие гамма-аминобутириловой кислоты было показано с помощью иммуноцитохимического метода и ВЭЖХ у *D. tigrina* [31], а также в тканях *Dugesia japonica* с помощью *in situ* гибридизации [32]. В нейронах планарий обнаружены нейропептиды, такие как соматостатин, мет-энкефалин, нейротензин и в-эндорфин [33–37]. Субстанция Р выявлена у *Stenostomum leucops* и *M. lineare* [38]. В нервной системе планарий *D. tigrina* был идентифицирован нейропептид F [13], а у *Artioposthia triangulata* [39],

D. tigrina и *Bdelloura candida* выявлены FMRF-подобные пептиды [40, 41]. Таким образом, литературные данные свидетельствуют о том, что нервная система этих животных является хорошо дифференцированной и специализированной. В ней присутствуют нейромедиаторы, свойственные позвоночным животным, а также специфические для данного таксона.

Настоящая работа посвящена идентификации биогенного амина серотонина у планарий *Schmidtea mediterranea* (Turbellaria, Platyhelminthes) с помощью иммуноцитохимического метода, позволяющего на современном уровне изучать нервную систему с использованием специфических антител, а также применения флуоресцентной или конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Задачами настоящего исследования являются определение морфологических параметров серотонинергических компонентов нервной системы планарий *S. mediterranea* и изучение функции серотонина у планарий. Впервые получены значительные количественные данные о числе и размерах серотонин-иммунопозитивных нервных компонентов. В статье также представлен обзор существующих литературных данных, посвященных изучению серотонина у планарий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект. Лабораторных планарий *Schmidtea mediterranea* (рис. 1а) содержали в аквариумах с водопроводной и дистиллированной водой в соотношении 2:1, в затененном помещении при температуре 19–21°C. На дно аквариума помещены плоские камни, под поверхностью которых животные любят собираться. Воду в аквариумах меняли один раз в 3–4 месяца. Кормили планарий два раза в неделю личинками насекомых (мотылем). После кормления остатки пищи удаляли со дна аквариума. Перед опытом животных оставляли голодными в течение 7 суток. Для иммуноцитохимического окрашивания отбирали особей размером 9–10 мм.

Иммуноцитохимический метод. Планарий *S. mediterranea* ($n = 12$ особей) плоско фиксировали, помещая их между предметным и покровным стеклом в каплю свежеприготовленного 4%-го параформальдегида (ПФА, МР Biomedicals, США) на 0.1 М фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7.4 (Helicon, Россия) на 2 ч при комнатной температуре, затем переносили в пробирки типа Eppendorf на 1.5 мл в параформальдегид на 4 ч при 4°C. После этого образцы промывали в 0.1 М фосфатно-солевом буфере, содержащем 0.3% Тритона X-100 (МР Biomedicals, Франция), 0.1% азида натрия (Helicon, Россия) и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (Amresco, Канада)

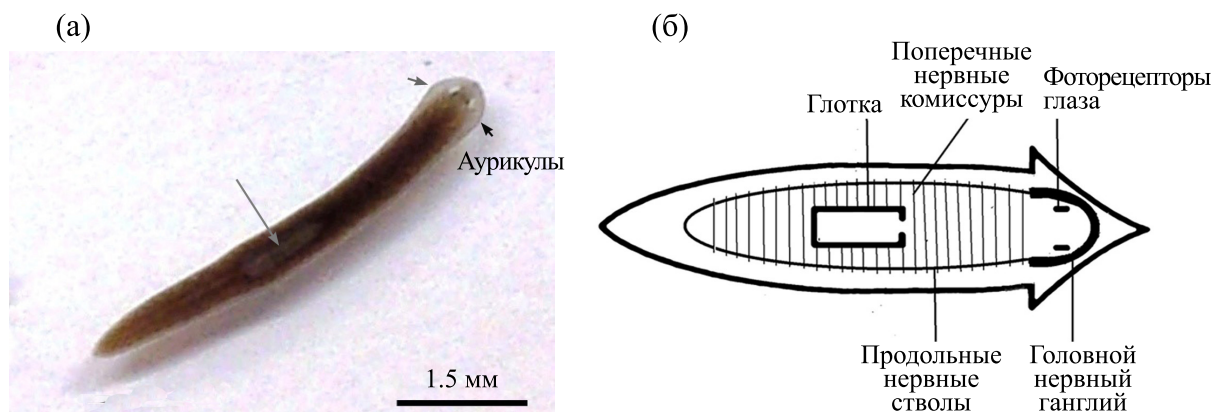


Рис. 1. Планария *Schmidtea mediterranea*: (а) — прижизненное фото, (б) — схема строения нервной системы планарий.

при 4°C в течение 18 ч. Полученные тотальные препараты планарий окрашивали с помощью коммерческих антител к серотонину. Для этого препараты инкубировали в течение 5 суток при 4°C с первичными антителами (Immunostar, США, разведение 1:500), полученными у кролика, затем промывали фосфатно-солевым буферным раствором с Тритоном X-100 в течение 24 ч и помещали во вторичные AlexaFluor488-меченые иммуноглобулины (козьи-антикроличьи, Abcam, США, в разведении 1:500 на фосфатно-солевом буфере) на 4 суток в темное место при 4°C. После этого промывали в фосфатно-солевом буфере в течение 2 ч. Затем препараты заключали в 75%-й раствор глицерина (Helicon, Россия) на фосфатно-солевом буфере под покровное стекло (Menzel-Glaser, Германия) и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Для контроля специфичности иммуноцитохимической окраски использовали по пять препаратов планарий. В качестве контроля окраски образцы инкубировали: (а) — только с вторичными иммуноглобулинами без использования первичных антител, (б) — использовали неиммунную сыворотку вместо первичной антисыворотки. Оба контроля показали отсутствие окраски в тканях планарий.

Микроскопия. Препараты планарий анализировали с помощью светового и флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B (Leica, Германия), оснащенного цифровой фотокамерой DC300F (Leica Microsystems, Германия). Для анализа в проходящем свете использовали фильтр BF (bright field). Для анализа локализации флуорохрома AlexaFluor488 использовали флуоресцентный фильтр I3 со спектром возбуждения при 450–490 нм и спектром эмиссии при 515 нм. Микрофотографии, полученные с помощью светового и флуоресцентного микроскопа, сохраняли и анализировали.

Компьютерная морфометрия изображений.

Морфометрический анализ параметров нервной системы планарий, таких как размеры головного нервного ганглия, серотониновых нейронов, расстояние между нервными стволами и комиссурами, осуществляли на изображениях, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа. Измерения проводили с помощью программы AxioVision Rel 4.8.1.0. (AxioVision, Carl Zeiss, Германия). Для каждого морфологического параметра выполняли не менее пяти измерений. Определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение измеряемых морфологических показателей нервной системы (табл. 1 и данные в тексте). Для максимальных и минимальных значений размеров нейронов применили следующий алгоритм: для полученного массива измерений считали медиану, затем отбирали все величины, которые больше медианы (как группу максимума), а те, которые меньше медианы, составили группу минимума. Для этих двух групп стандартно вычисляли среднее значение и стандартное отклонение. Расчеты проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007. Для создания иллюстраций использована программа Adobe Photoshop CS2 10.0. (Adobe Systems Inc., США). Статистический анализ морфологических показателей нервной системы (табл. 1) был проведен с помощью критерия Стьюдента (непарного two-tailed теста, для доверительного уровня 95%, при котором значение $P < 0.05$). Для этого использовали статистическую программу GrafPad Prizm 3 (Graphpad Software, Inc., США).

Регенерация глаз. В подопытную и контрольную группу отбирали особей *S. mediterranea* одинакового размера (6–7 мм). Животных перед экспериментом выдерживали голодными в течение 7 суток. В ходе операции животным отсекали головной конец тела, примерно 1/6 части тела. Прооперированных особей помещали в стеклянные стаканчики, содержащие 150 мл воды (кон-

Таблица 1. Морфологические параметры серотонинергических компонентов в нервной системе планарий *S. mediterranea*

Параметры нервной системы	Головной отдел (1)	Середина тела (2)	Хвостовой отдел (3)
Толщина дуги головного ганглия	130.7 ± 3.7 ($n = 15$)	—	—
Расстояние от кончика головы до головного ганглия	275.8 ± 4.4 ($n = 5$)	—	—
Расстояние от бокового края тела до нервного ствола	386.6 ± 9.6 ($n = 10$)	408.1 ± 53.1 ($n = 10$) $P1 < 0.2723$ ns	330 ± 51.1 ($n = 10$) $**P2 < 0.0057$ $**P3 < 0.0033$
Толщина нервных стволов	93.3 ± 9.6 ($n = 20$)	74.5 ± 16.1 ($n = 23$) $***P1 < 0.0001$	45.3 ± 5.1 ($n = 20$) $***P2 < 0.0001$ $***P3 < 0.0001$
Расстояние между нервными стволами	447.2 ± 44.5 ($n = 14$)	477.2 ± 31.1 ($n = 16$) $*P1 < 0.0396$	251.8 ± 30.8 ($n = 18$) $***P2 < 0.0001$ $***P3 < 0.0001$
Расстояние между комиссурами	71.6 ± 8.1 ($n = 15$)	95.5 ± 19.9 ($n = 18$) $***P1 < 0.0002$	71.2 ± 9.9 ($n = 22$) $P2 < 0.8655$ ns $***P3 < 0.0001$
Длина нейронов (max)	17.3 ± 1.6 ($n = 19$)	17.2 ± 1.3 ($n = 23$)	15.7 ± 1.0 ($n = 25$)
Длина нейронов (min)	13.5 ± 1.5 ($n = 19$)	14.3 ± 1.1 ($n = 23$)	12.9 ± 1.1 ($n = 25$)
Длина нейронов (средний)	15.4 ± 2.4 ($n = 38$)	15.8 ± 1.8 ($n = 46$) $P1 < 0.46$ ns	14.3 ± 1.7 ($n = 50$) $*P2 < 0.0176$ ns $***P3 < 0.0002$
Ширина нейронов (max)	11.5 ± 0.9 ($n = 17$)	12.2 ± 0.9 ($n = 23$)	10.7 ± 1.8 ($n = 24$)
Ширина нейронов (min)	9.7 ± 0.8 ($n = 21$)	10.1 ± 0.8 ($n = 23$)	10.2 ± 1.1 ($n = 26$)
Ширина нейронов (средний)	10.4 ± 1.2 ($n = 38$)	11.1 ± 1.4 ($n = 46$) $*P1 < 0.0334$	10.5 ± 1.4 ($n = 50$) $P2 < 0.9669$ ns $*P3 < 0.0351$
Длина нейронов нервного плексуса	14.5 ± 1.5 ($n = 30$)	14.8 ± 1.5 ($n = 30$) $P1 < 0.5162$ ns	15.3 ± 1.6 ($n = 30$) $P2 < 0.0505$ ns $P3 < 0.1791$ ns
Ширина нейронов нервного плексуса	9.2 ± 0.9 ($n = 30$)	10.1 ± 1.3 ($n = 30$) $**P1 < 0.0038$	11.1 ± 1.3 ($n = 30$) $***P2 < 0.0001$ $**P3 < 0.0029$

Примечание. $P1$ — значение вероятности различий средних значений в колонках 1 и 2; $P2$ — в колонках 1 и 3; $P3$ — в колонках 2 и 3; ns — нет статистически значимых различий. Данные представлены в мкм как среднее $\pm$ стандартное отклонение, n — число измерений.

трольная группа) или свежеприготовленного раствора серотонина в концентрации 1.0 и 0.1 мкМ (подопытные группы) и оставляли регенерировать в темноте при $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Опыты проводили методом слепого контроля, наблюдателю не было известно, какая группа контрольная, а какая подопытная. Начиная с третьих суток после операции в одно и то же время каждую планарию просматривали под бинокулярным микроскопом Stemi DV4 (Carl Zeiss, Германия), оценивая появление глаз и стадию их дифференцировки. Визу-

альные наблюдения сопровождались прижизненной фотосъемкой с помощью цифровой фотокамеры Scopetek DCM130E («Микромед», Россия), соединенной с бинокулярным микроскопом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Иммуноцитохимическое определение серотонина в нервной системе планарий *S. mediterranea*. На дорзальной стороне головного отдела тела расположена пара глаз (рис. 1а, 2а, 3а) и «ушек», или

аурикул. Иммуноцитохимическое исследование тотальных препаратов выявило наличие серотонин-иммунопозитивной окраски в нервной системе *S. mediterranea*. У планарий обнаружено обилие серотонин-иммунопозитивных клеток и нервных волокон (нейритов). Серотонин-иммунопозитивные нейроны и их отростки выявлены в составе головного нервного ганглия, пары брюшных нервных стволов и нервных комиссур (рис. 2), входящих в состав центральной нервной системы планарий. Головной нервный ганглий расположен в переднем отделе тела и имел форму дуги (рис. 1б, 2б). Внутренняя часть окрашенного антителами к серотонину головного ганглия, как и нервных стволов, состоит из тонких серотонин-иммунопозитивных нервных волокон (рис. 2б). На тотальных препаратах планарий в головном конце тела удалось насчитать 150.9 ± 8.8 (число особей $n = 9$) на площади $850\text{--}920 \text{ мкм}^2$. У *S. mediterranea* тела серотонин-иммунопозитивных нейронов располагались в основном по периферии головного ганглия. Число серотониновых нейронов, ассоциированных с дугой головного ганглия, составило 75.6 ± 3.4 (число особей $n = 5$).

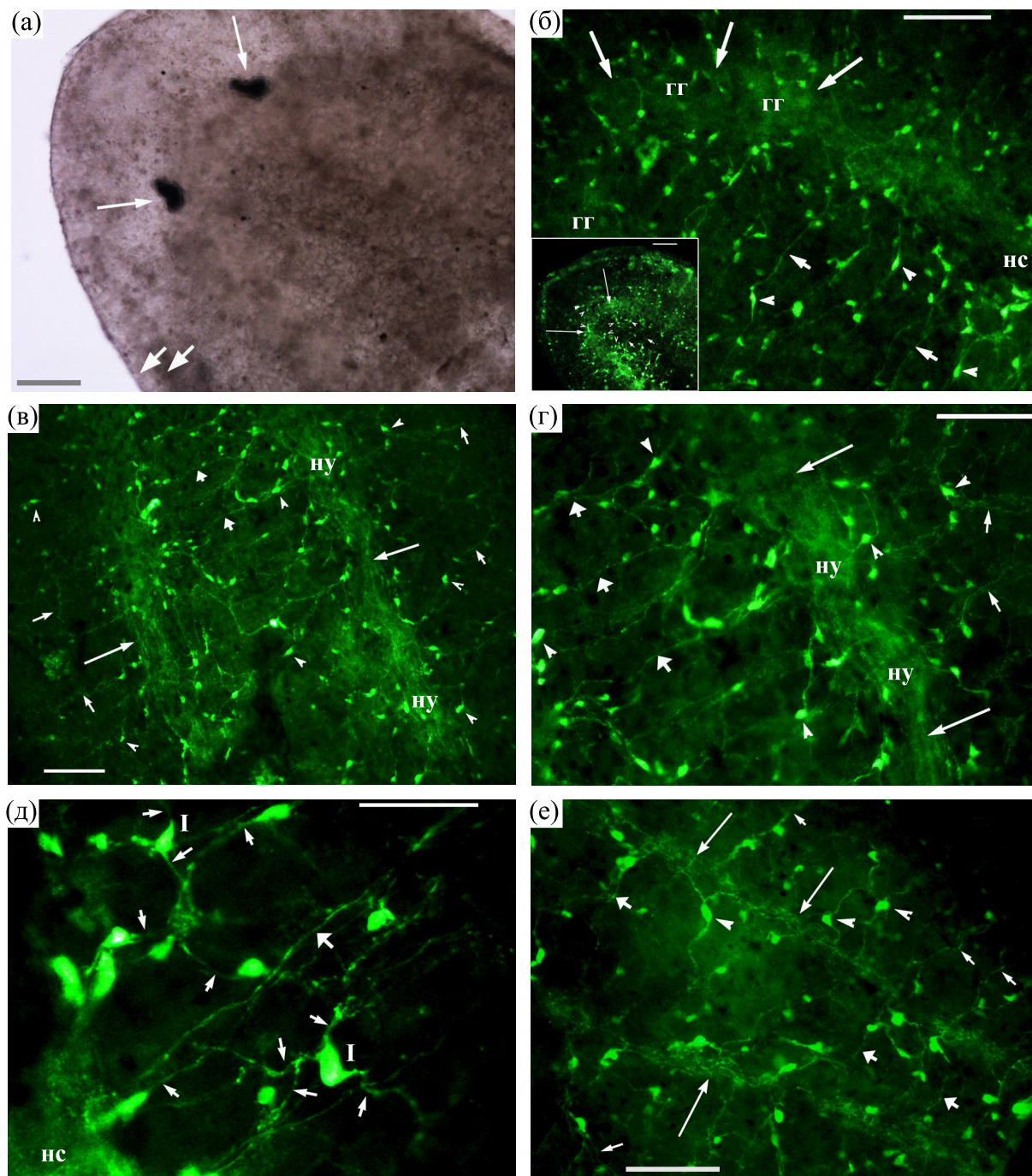
Оказалось, что вдоль внутренней поверхности дуги головного ганглия располагается больше серотонинергических нейронов, чем по его внешней поверхности, соотношение составляет примерно 65:35%. По нашим наблюдениям, в головном ганглии распространены униполярные и псевдоуниполярные нейроны, биполярные нейроны видны нечасто, и расположены они преимущественно с внутренней стороны ганглия, редко можно заметить мультиполярные нейроны. Средние размеры нейронов головного конца тела, и толщина дуги головного ганглия, а также глубина его залегания указаны в табл. 1.

Брюшные нервные стволы берут начало от головного ганглия и тянутся вдоль всего тела к хвостовому концу планарии (рис. 2в–д). Брюшные нервные стволы связаны поперечными тонкими нервными комиссурами (рис. 1б, 2в–д). Тела серотонин-иммунопозитивных, в основном мультиполярных нейронов расположены по периферии нервных стволов. По внутренней границе нервных стволов распространены биполярные нейроны, по внешней — псевдоуниполярные. Вдоль нервных комиссур хорошо заметны вытянутые веретенообразные тела биполярных серотонин-иммунопозитивных нейронов, входящих в состав комиссуры (рис. 2б). Между двумя нервными стволами по всей длине тела животного расположено множество мультиполярных нейронов, имеющих не менее трех отростков (от трех до четырех-пяти), вероятно, также входящих в состав комиссур или просто ответвлений, формирующих внутреннюю нервную сеть (рис. 2д). Наблюдаются периодические утолщения нервных

стволов — нервные узлы. В нервных узлах отмечена большая аккумуляция нейронов — от 5 до 8 (рис. 2в,г). Толщина нервных стволов в области нервного узла примерно вдвое больше толщины нервного ствола вне узла, указанной в табл. 1. Толщина нервных стволов планарий изменяется от наибольшей в головном отделе тела до минимальной в хвостовом отделе (табл. 1). В головном и хвостовом отделах расстояния между нервными комиссурами сравнительно небольшие, а в центральном отделе расстояние между комиссурами увеличивается (табл. 1), при этом повышается их разветвленность и увеличивается количество ответвлений. Это может быть связано с иннервацией важной области тела — окологлоточной, расположенной как раз в центральном районе: здесь находится ротовое отверстие и глоточный карман, в котором лежит мускулистая глотка, принимающая активное участие в поглощении пищи.

Выявлены многочисленные серотонин-иммунопозитивные нервные волокна, направляющиеся от нервного ствола к боковому краю тела, разветвляющиеся (рис. 2в,г,е). Между боковым краем тела и нервным стволом расположены тела мультиполярных серотонин-иммунопозитивных нейронов, реже биполярных, форма тел нейронов округлая или овальная. Вместе многочисленные серотонин-иммунопозитивные нервные волокна и тела нейронов составляют периферические отделы нервной системы, а именно субмышечный и субэпителиальный нервные плексусы. Нейроны плексуса, расположенные в головном отделе тела, пусть и незначительно, но уступают в размерах нейронам головного ганглия. Нейроны нервного плексуса в центральном отделе примерно соответствуют по размерам нейронам, ассоциированным с нервными стволами. Нейроны нервного плексуса в хвостовом отделе, пусть и незначительно, но превосходят по размерам нейроны, связанные с нервными стволами хвоста (табл. 1). По нашим наблюдениям, в первой трети тела нейроны нервного плексуса имеют преимущественно овальную или прямоугольную форму; во второй трети тела — преимущественно округлую или веретенообразную; в третьей — тела серотонин-иммунопозитивных нейронов чаще неправильной формы («звезды», «кляксы»). Таким образом, варьирование размера и формы серотониновых нейронов, а также числа нейритов, отходящих от тела клетки (уни-, би- и мультиполярность) могло зависеть, вероятно, как от места их локализации в теле планарии, так и от возможной функциональной роли.

Влияние серотонина на регенерацию глаз у планарий *S. mediterranea*. При проведении опытов у планарий *S. mediterranea* наблюдали за динамикой появления глаз (или фоторецепторов) после отсечения головного конца тела. Всего было прооперировано более 850 животных. Регенерация



глаз у *S. mediterranea* проходила в разных группах с третьих по пятые сутки после операции. За это время их структура претерпевала несколько стадий развития: сначала может появиться один глаз, а затем второй; иногда, если появилось сразу два глаза, то один из них может быть развит слабее, чем второй; кроме того, даже если оба глаза уже видны на третьей или четвертые сутки регенерации, они все еще достаточно слабо развиты, по сравнению с интактными глазами (рис. 36,в).

Максимальное число особей *S. mediterranea* с дифференцированными фоторецепторами наблюдали в большинстве групп на четвертые сутки регенерации. В каждой из групп число особей с фоторецепторами в разной степени дифференцировки варьировало, вероятно, в зависимости от индивидуальной регенерационной способности. При этом с каждым днем увеличивалось число более развитых глаз, к четвертым-пятым суткам регенерации происходило усиление степени диф-

Рис. 2. Микрофотографии препаратов планарий *Schmidtea mediterranea*: (а, б) — головной, (в–д) — срединный, (е) — хвостовой отделы тела. На всех микрофотографиях ориентация головного конца тела планарии — к верхнему левому углу, как на (а). Иммуноцитохимическая окраска к серотонину (зеленым на цветных, светлым — на черно-белых); (а) — световая, (б)–(е) — флуоресцентная микроскопия; тотальные препараты. (а) — Головной конец тела, общий вид с парой простых глаз (или фоторецепторов), расположенных на дорзальной поверхности (длинные стрелки), и аурикулами (толстая стрелка). (б) — Окраска к серотонину в головном ганглии (гг), имеющем форму дуги — врезка (длинные стрелки), поперечные комиссуры (тонкие короткие стрелки) соединяют ганглии и нервные стволы (нс) в головном отделе тела. Отмечены тела серотонинергических нейронов (острия стрелок) в головном ганглии и пространстве между нервными стволами. (в) — Срединный отдел туловища, серотонин-иммунопозитивных волокна в нервных стволах (длинные стрелки) с утолщениями — нервными узлами (ну) — и в поперечных нервных комиссурах (тупые короткие стрелки), тела серотонин-иммунопозитивных нейронов отмечены остриями стрелок. (г) — Большее увеличение, середина тела, отмечены нервные стволы (длинные стрелки), нервные узлы (ну) и серотонин-иммунопозитивные нервные комиссуры (тупые короткие стрелки), тела би- и мультиполярных нейронов (острия стрелок), заметны волокна субмышечного нервного плексуса (короткие тонкие стрелки) между нервными стволами и боковыми краями тела. (д) — Большее увеличение средней части тела с многочисленными телами нейронов, два мультиполярных нейрона отмечены (I), а также их отростками (тонкие короткие стрелки), расположенными между нервными стволами, виден левый ствол (нс), и тонкими поперечными комиссурами, одна из которых отмечена короткой тупой стрелкой. (е) — Хвостовой отдел тела, нервные стволы истончаются (длинные стрелки), комиссуры менее заметны (тупые короткие стрелки), тела серотонин-иммунопозитивных нейронов отмечены остриями стрелок, а волокна нервного плексуса — тонкими короткими стрелками. Масштаб: (а)–(г), (е) — 100 мкм; (д) — 50 мкм.

ференцированности фоторецепторов за счет добавления пигментных и светочувствительных клеток, далее дифференцировка глаз должна продолжаться до полного их восстановления. Итак, мы показали, что процесс регенерации глаз у планарий поддается качественному и количественному анализу.

Изучение влияния серотонина на регенерацию показало, что он ускоряет дифференцировку фоторецепторов в подопытных группах планарий. Так, на третьи-четвертые сутки регенерации процент особей с двумя глазами был больше в подопытных группах, чем в контрольных, в семи опытах из восьми (табл. 2), проведенных в разное время. При этом в одном опыте с концентрацией серотонина 10 мкМ эффект не был выявлен. Таким образом, серотонин оказывал положительное влияние на регенерацию глаз в концентрациях 0.01–1.00 мкМ. Исследования в данном направлении продолжаются.

ОБСУЖДЕНИЕ

Серотонин [42] — широко распространенный нейромедиатор в нервной системе человека и животных. Он обнаружен у большинства животных, стоящих на различных ступенях эволюционной лестницы. Как нейротрансмиттер, серотонин у позвоночных животных регулирует чувство голода, температуру тела, болевую чувствительность, а также модулирует настроение, возбуждение, сексуальное поведение и выделение гормонов.

Серотонин к настоящему времени обнаружен у более чем 40 представителей паразитических червей: трематод, цестод и моногеней [43, 44], с помощью различных методов исследования. Такой интерес к изучению нервной системы паразитических червей связан с их большим медицинским, сельскохозяйственным и экономическим значением. В то же время представителям свободноживущих червей — турбеллярий (или плана-

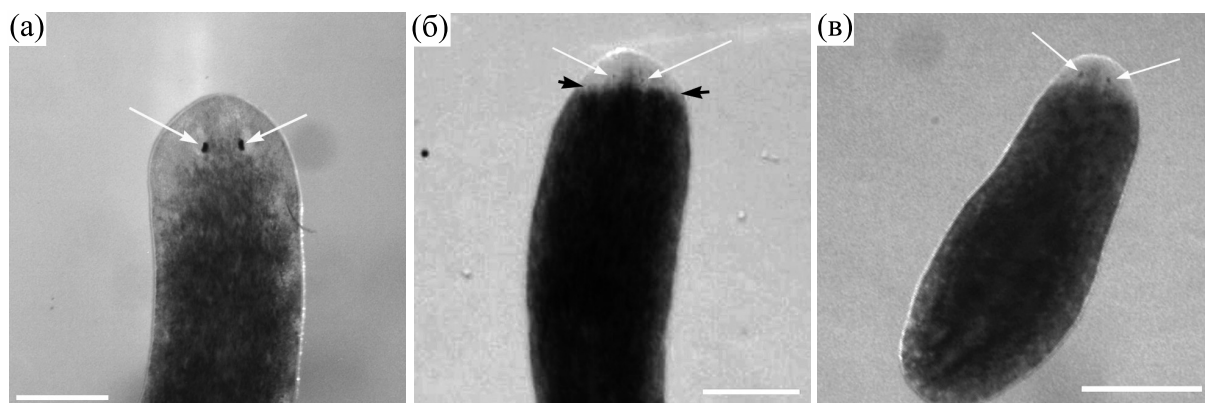


Рис. 3. Планария *Schmidtea mediterranea*: (а) — интактная, хорошо развитые глаза (стрелки); (б) — на третьи сутки после операции, появление двух слабо развитых глаз (длинные стрелки), граница головной регенерационной бластемы отмечена короткими стрелками; (в) — четвертые сутки регенерации фоторецепторов, стрелки. Масштаб: (а) и (б) — 1 мм, (в) — 1.5 мм.

Таблица 2. Регенерация глаз у планарий *Schmidtea mediterranea*, находящихся под воздействием серотонина, количество животных и их процент от общего числа

Дата постановки опыта	Группы	Стадии регенерации, %			Число особей
		Два глаза	Один глаз	Без глаз	
22/11/19 4д	контроль серотонин 10 мкМ	53.0–79.9 54.0–77.1	12.0–17.6 9.0–12.9	3.0–4.4 7.0–10.0	$n = 68$ $n = 70$
30/11/20 3д	контроль серотонин 1 мкМ	8.0–10.7 23.0–30.7 ↑	8.0–10.7 6.0–8.0	59.0–78.7 46.0–61.3	$n = 75$ $n = 75$
24/01/20 4д	контроль серотонин 1 мкМ	36.0–50.7 46.0–66.7 ↑	21.0–29.6 14.0–20.3	14.0–19.7 9.0–13.1	$n = 71$ $n = 69$
21/01/20 4д	контроль серотонин 1 мкМ	47.0–63.5 56.0–76.7 ↑	15.0–20.3 10.0–13.7	12.0–16.2 7.0–9.6	$n = 74$ $n = 73$
22/03/19 4д	контроль серотонин 0.1 мкМ	9.0–36.0 15.0–62.5 ↑	7.0–28.0 6.0–25.0	9.0–36.0 3.0–12.5	$n = 25$ $n = 24$
21/02/19 4д	контроль серотонин 0.1 мкМ	16.0–69.6 26.0–92.9 ↑	4.0–17.4 1.0–3.6	3.0–13.0 1.0–3.6	$n = 23$ $n = 28$
17/06/18 4д	контроль серотонин 0.1 мкМ	61.0–85.9 70.0–92.1 ↑	7.0–9.9 5.0–6.6	3.0–4.2 1.0–1.3	$n = 71$ $n = 76$
15/03/19 4д	контроль серотонин 0.01 мкМ	14.0–40.0 16.0–2.7 ↑	6.0–4.0 4.0–18.2	5.0–20.0 2.0–9.1	$n = 25$ $n = 22$

Примечание. ↑ – Направление эффекта серотонина; 3д, 4д – дни наблюдения.

рий) уделялось гораздо меньше внимания. Серотонин был идентифицирован в тканях нескольких видов планарий: *Dendrocoelum lacteum* [45, 46], *Polycelis nigra* [47], *Dugesia tigrina* [48], *Polycelis tenuis* [46], *Dugesia japonica* [49], *Bipalium kewense* [50]. У *Crenobia alpina* серотонин-положительные клетки связаны с брюшными нервными стволами или разбросаны в периферической нервной сети [51]. У *Castrella truncata* серотонин был выявлен в мозге, трех парах нервных стволов, глоточном нервном кольце [52]. Серотонин был найден в нейронах глотки [48, 53] и центральной нервной системы планарий *Girardia tigrina* и *S. mediterranea* [54–56]. Большинство данных были получены при изучении серийных срезов тканей планарий.

В настоящей работе для идентификации были использованы препараты планарий *S. mediterranea*. Использование тотальных препаратов и иммуноцитохимической окраски к серотонину позволяет проследить взаимоотношения серотонинергических элементов в нервной системе планарий и извлечь максимум информации об их пространственной локализации в различных отделах тела, не прибегая к необходимости реконструкции морфологических данных, полученных с помощью серийных срезов. Проведенные нами

исследования подтвердили присутствие серотонина у планарий *S. mediterranea*. Окраска к серотонину была интенсивной в центральных (головной ганглий, нервные стволы и комиссуры) и периферических (нервные плексусы) отделах нервной системы планарий. Полученные нами данные о локализации серотонинергических нейронов в отделах нервной системы *S. mediterranea* согласуются со сведениями, имеющимися в отношении других видов планарий [46, 47, 55].

В настоящей работе были выявлены дополнительные, не описанные ранее детали строения нервной системы. Так, отмечено большое число серотонин-иммунопозитивных нейронов, расположенных между нервными стволами, а также нервная сеть многочисленных и разветвленных серотонин-иммунопозитивных нервных волокон между нервным стволом и боковой поверхностью тела. Выявлено, что серотонин-иммунопозитивные клетки имели более округлую форму в головной ганглии планарий, а в нервных стволах тела нейронов были более вытянуты вдоль нервных стволов и имели овальную или неправильную форму. Обнаружена специфическая локализация большинства серотонин-иммунопозитивных

клеток по внутренней поверхности головного ганглия и брюшных нервных стволов.

В отношении планарий *S. mediterranea* количественной оценки серотонинергических компонентов не существовало, морфометрический анализ их нервной системы не проводился, исследования были затруднены как достаточно большими размерами этих животных (до 1.2 см в длину), так и трудностью получения качественной иммуноцитохимической окраски. Мы провели окраску нервной системы на тотальных препаратах и впервые получили детальные данные о параметрах серотонинергических компонентов и их распределении в нервной системе планарий *S. mediterranea* с использованием большого числа повторных измерений. Полученные результаты позволили отметить, что наибольшее количество серотониновых нейронов располагается в головном конце планарий, число их уменьшается по направлению к хвостовому концу. Толщина дуги головного ганглия у *S. mediterranea* также превышала толщину отходящих от нее нервных стволов. Толщина стволов постепенно уменьшалась от головного конца тела к хвостовому. Нами впервые получены достоверные статистические данные о различии морфологических параметров, таких как толщина нервных стволов, расстояние между стволами, расстояние между комиссурами, а также размеров серотониновых нейронов, входящих в состав центральной нервной системы, и находящихся в разных зонах тела планарий *S. mediterranea*. Таким образом, полученные нами сведения о размерах и количестве серотонин-иммунопозитивных нейронов в головном ганглии, и морфологических показателях других серотонинергических структур указывают на продвинутый процесс централизации нервной системы планарий в процессе ее эволюции.

Сами по себе морфологические характеристики являются ценным методом количественной оценки компонентов нервной системы у разных видов планарий. Эти сведения могут быть полезны при проведении сравнительного анализа нервной системы у представителей свободноживущих и паразитических видов плоских червей. Помимо этого, знание размерных характеристик интактной нервной системы планарий может быть использовано при изучении дифференцировки серотониновых нейронов в ходе регенерации. Это позволит не только качественно, но и количественно оценивать степень восстановления нервных структур после операции, такие исследования уже начаты в нашей лаборатории.

О физиологической роли серотонина у планарий в литературе имеются немногочисленные данные. Так, серотонин стимулировал двигательную активность взрослых особей и личиночных форм паразитических плоских червей [57, 58]. Се-

ротонин также проявлял возбуждающее влияние на мышечные препараты и изолированные мышечные клетки паразитических червей [59–61]. Роль серотонина, как возбуждающего нейромедиатора, показана и в отношении мускулатуры планарий *Bdelloura candida* [40] и *Procerodes littoralis* [54]. Функциональные тесты выявили положительное влияние серотонина на биение ресничек, покрывающих поверхность тела планарий и способствующих передвижению животных в воде [62]. Наконец, есть отрывочные и давние сведения об участии серотонина в регенерационных процессах у планарий [63].

Помимо изучения морфологических характеристик нервной системы нами в настоящей работе начато исследование функции серотонина в организме планарий *S. mediterranea*. Для этого нами была использована модель регенерации фоторецепторов (глаз) после отсечения головного конца тела. Глаза планарий состоят из фоторецепторных и пигментных клеток, расположенных на дорзальной поверхности тела, с помощью которых животные могут различать интенсивность и направление светового потока [64]. Глаза планарий регенерируют после ампутации головного конца тела. Определены сроки появления глаз в ходе регенерации, так, у планарий *Girardia tigrina* регенерация глаз происходила с третьих по шестые сутки в отсеченных срединных и хвостовых фрагментах тела [65].

В настоящей работе показано, что у планарий процесс регенерации глаз не только поддается качественному описанию с помощью визуального наблюдения, но и описывается с помощью определенных количественных критериев, характерных для группы регенерирующих особей. Разработанные нами показатели регенерации глаз отражают степень их дифференцировки: сначала может появляться один глаз, затем второй, если сразу появляются оба глаза, один из них может быть развит слабее, чем второй, или оба глаза все еще слабо развиты. Ранее при изучении регенерации глаз у планарий *Polycelis tenuis* и *Dugesia tigrina* применялись функциональные тесты, основанные на реакции отрицательного фототаксиса (или избегания света), которая постепенно восстанавливается в ходе регенерации [64]. О биохимической регуляции процесса регенерации фоторецепторов практически ничего не известно. У планарий *G. tigrina* было обнаружено, что серотонин в концентрации 1.0 и 0.1 мкМ ускорял регенерацию глаз в отсеченных срединных фрагментах тела на 5-й день их регенерации [65]. Настоящее исследование продемонстрировало влияние серотонина на регенерацию глаз и у планарий *S. mediterranea*. Ранее зарубежными авторами было показано, что инъекция триптофангидроксилазы, ключевого фермента участвующего в синтезе серотонина, является необходимым условием

восстановления пигментации глаз в ходе их регенерации у планарий после нокаута гена фермента TRH с помощью РНК интерференции [66]. Экспериментальные данные о положительном влиянии серотонина на регенерацию глаз у планарий являются первым шагом для дальнейшего детального изучения наблюдаемого эффекта и выявления клеточных и молекулярных механизмов этого влияния. Исследования процесса регенерации глаз у планарий будут нами продолжены, а результаты будут проанализированы в отдельной статье, посвященной регенерации фоторецепторов, с привлечением литературных молекулярно-биологических данных и обсуждением генов-регуляторов, участвующих в этом процессе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа посвящена исследованию локализации и функциональной активности биогенного амина, серотонина у планарий. С помощью современного иммуноцитохимического метода, флуоресцентной микроскопии и использования тотальных препаратов, впервые изучены и описаны количественные морфологические характеристики серотонинергических нейронов головного ганглия и нервных стволов у *S. mediterranea*. Результаты позволяют детально охарактеризовать строение нервной системы у изучаемого вида и дополняют имеющиеся сведения о строении нервной системы планарий. Полученные данные и имеющиеся литературные сведения свидетельствуют о широком распространении серотонина в нервной системе представителей Platyhelminthes. Это, в свою очередь, указывает на важное эволюционное значение биогенного амина, который присутствует у животных, находящихся на самых ранних этапах эволюционного развития. Обнаружено влияние серотонина на регенерационные процессы, происходящие в организме планарий *S. mediterranea*. Функциональная роль серотонина у плоских червей остаются мало изученной вследствие почти полного отсутствия лабораторных моделей среди паразитических видов, а также трудности их добывания из природных источников в достаточном количестве. В этой связи планарии, введенные в лабораторную культуру, могут стать удобным биологическим объектом для проведения таких исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе было использовано оборудование Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (Пушино, Россия).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Котикова Е. А. Нервная система *Anoploplidium mediale* (Turbellaria, Anoplodiidae). *Паразитология*, **20** (2), 149–151 (1986).
2. Reuter M. and Gustafsson M. The flatworms nervous system – pattern and phylogeny. In: *The nervous system of Invertebrate - Evolutionary and Comparative Approach.*, Ed. by O. Breidbach and W. Kutsch (Birkhauser Verlag, Basel, 1995), pp. 25–59.
3. Evolution and regeneration of the planarian central nervous system. *Develop. Growth Differ. Develop. Growth Differ.*, **51**, 185–195 (2009). DOI: 10.1111/j.1440-169X.2009.01099.x
4. Durant F., Lobo D., Hammelman J., and Levin M., Physiological controls of large-scale patterning in planarian regeneration: a molecular and computational perspective on growth and form. *Regeneration*, **3** (2), 78–103 (2016). DOI: 10.1002/reg2.54
5. Chachain N. F., Abdulhadi F. S. and Mzhr N. N. Systems of the body as a planaria, biology, ecology and regeneration: a review. *Biochem. Cell. Arch.*, **20** (1), 1619–1622 (2020).
6. Крещенко Н. Д. Изучение механизмов действия FMRF-подобных пептидов на мышечное сокращение у планарий (Platyhelminthes). *Биофизика*, **66** (3), 555–566 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921030157
7. Robb S. M. C., Gotting K., Ross E., and Sanchez Alvarado A. SmedGD 2.0: The Schmidtea mediterranea genome database. *Genesis*, **53** (8), 535–546 (2015). DOI: 10.1002/dvg.22872
8. Schmidt D., Reuter H., Hüttner K., Ruhe L., Rabert F., Seebeck F., Irimia M., Solana J., and Bartscherer K., The Integrator complex regulates differential snRNA processing and fate of adult stem cells in the highly regenerative planarian *Schmidtea mediterranea*. *PLoS Genet.*, **14** (12), e1007828 (2018). DOI: 10.1371/journal.pgen.1007828
9. Bagunà J. Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* N. sp. *J. Exp. Zool.*, **195** (1), 65–79 (1976).
10. Kotikova E. A. Comparative characterization of the nervous system of the Turbellaria. *Hydrobiologia*, **132**, 89–92 (1986).

11. Котикова Е. А. Ортогон плоских червей и основные пути его эволюции. Морфологические основы филогенетики плоских червей. *Тр. Зоол. ин-та АН СССР*, **241**, 88–111 (1991).
12. Joffe B. I. and Reuter M. The nervous system of *Bothriomolus balticus* (Proseriata) – a contribution to the knowledge of the orthogon in the Plathelminthes. *Zoomorphology*, **113**, 113–127 (1993).
13. Reuter M., Maule A. G., Halton D. W., Gustafsson M. K. S., and Shaw C. The organization of the nervous system in Plathelminthes. The neuropeptide F-immunoreactive pattern in Catenulida, Macrostromida, Proceriata. *Zoomorphology*, **115**, 83–97 (1995).
14. Reuter M., Mäntylä K., and Gustafsson M. K. S. Organization of the orthogon – main and minor nerve cords. *Hydrobiologia*, **383**, 175–182 (1998).
15. Koopowitz H. Primitive Nervous Systems. A Sensory Nerve-Net in the Polyclad Flatworm *Notoplana acticola*. *Biol. Bull.*, **145** (2), 352–359 (1973).
16. Baguna J. and Ballester R. The nervous system in Planarians: peripheral and gastrodermal plexuses, pharynx innervation, and the relationship between central nervous system structure and the acoelomate organization. *J. Morph.*, **155**, 237–252 (1978).
17. Reuter M. and Gustafsson M. K. S. “Neuorendocrine cells” in flatworms Progenitors to metazoan neurones? *Arch. Histol. Cytol.*, **52**, 253–263 (1989).
18. Reuter M. and Halton D. W. Comparative neurobiology of Platyhelminthes. In: *Interrelationships of Platyhelminthes*, Ed. by D. T. J. Littlewood and R. A. Bray (Taylor & Francis, London, New York, 2001), pp. 239–249.
19. Morita M. and Best J. B. Electron microscopic studies on Planaria. II. Fine structure of the neurosecretory system in the planarian *Dugesia dorotocephala*. *J. Ultrastruc. Res.*, **13** (5/6), 398–408 (1965).
20. Lender T. The role of neurosecretion in freshwater planarians. In: *Biology of the Turbellaria*, Ed. by N. W. Riser and M. P. Morse (Mc Craw-Hill, London, 1974), pp. 460–475.
21. Кудикина Н. П. Организация эндокринной функции у плоских червей. *Вест. Балтийского федерального университета им. И. Канта*, **7**, 126–131 (2011).
22. Тирас Х. П., Шейман И. М. и Сахарова Н. Ю. Активность АХЭ в нервной системе некоторых трикладид (класс ресничных червей). *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **11** (4), 427–429 (1975).
23. Котикова Е. А. и Иоффе Б. И. Катехоламины и холинэстеразы в нервной системе турбеллярии. *Pro-vortex karlingi. Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **24** (2), 142–148 (1988).
24. Lentz T. L. Histochemical localization of acetylcholinesterase activity in a planarian. *Comp. Biochem. Physiol.*, **27** (3), 715–716 (1968). DOI: 10.1016/0010-406X(68)90612-9
25. Erzen I. and Brzin M. Cholinergic mechanisms in *Planaria torva*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **64**, 207–216 (1979). DOI: 10.1016/0306-4492(79)90050-9
26. Welsh J. H. and King E. C. Catecholamines in planarians. *Comp. Biochem. Physiol.*, **36** (4), 683–686 (1970).
27. Reuter M. and Eriksson K. Catecholamines demonstrated byglyoxylic acid-induced fluorescence and HPLC in same microturbellarians. *Hydrobiologia*, **227**, 209–220 (1991).
28. Joffe B. I. and Kotikova E. A. Distribution of catecholamines in turbellarians with a discussion of neuronal homologies in the Plathelminthes. In: *Simpler Nervous Systems*, Ed. by D. A. Sakharov, and W. Winlow (Manchester University Press, Manchester, NewYork, 1991), pp. 77–112.
29. Wikgren M., Reuter M., Gustafsson M. K. S., and Lindroos P. Immunocytochemical localization of histamine in flatworms. *Cell Tiss. Res.*, **260**, 479–484 (1990). DOI: 10.1007/BF00297227
30. Eriksson K. S. Nitric oxide synthase in the pharynx of the planarian *Dugesia tigrina*. *Cell Tiss. Res.*, **286**, 407–410 (1996).
31. Eriksson K. S. and Panula P. Gamma-aminobutyric acid in the nervous system of a planarian. *J. Comp. Neurol.*, **345** (4), 528–533 (1994). DOI: 10.1002/cne.903450405
32. Nishimura K., Kitamura Y., Umesono Y., Takeuchi K., Takata K., Taniguchi T., and Agata K. Identification of glutamic acid decarboxylase gene and distribution of GABAergic nervous system in the planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience*, **153** (4), 1103–1114 (2008). DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.026
33. Shilt J., Richoux J. P., and Dubois M. P. Demonstration of peptides immunologically related to vertebrate neurogormones in *Dugesia lugubris* (Turbellaria, Tricladida). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **43** (3), 331–335 (1981).
34. Carraway R., Ruane S. E. and Kim H.-R. Distribution and immunochemical character of neurotensin-like material in representative vertebrates and invertebrates: apparent conversation of the COOH-terminal region during evolution *Peptides*, **1**, 115–123 (1982).
35. Venturini G., Carolei A., Palladini G., Margotta V., and Lauro M. G. Radioimmunological and immuno-cytochemical demonstration of Met-enkephalin in planaria. *Comp. Biochem. Physiol.*, **74**, 23–25 (1983). DOI: 10.1016/0742-8413(83)90141-x
36. Kerschbaum H., Polhammer K., Hacker G., Treibl-mayr K., and Adam H. Endorphin ähnliche Immuno-reactivität bei *Crenobia alpina* (Turbellaria, Tricladida). *Mikroskopie*, **41**, 30–33 (1984).

37. Bautz A. and Shilt J. Somatostatin-like peptide and regeneration capacities in planarians. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **64**, 267–272 (1986).
38. Reuter M. Substance P immunoreactivity in sensory structures and the central and pharyngeal nervous system of *Stenostomum leucops* (Catenulida) and *Microstomum lineare* (Macrostomida). *Cell Tiss. Res.*, **276**, 173–180 (1994).
39. Curry W. J., Shaw C., Johnston C. F., Thim L., and Buchanan K. D. Neuropeptide F: primary structure from the Turbellarian, *Artioposthia triangulate*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **110** (2), 269–274 (1992). DOI: 10.1016/0742-8413(92)90272-9
40. Johnston R. N., Shaw C., Halton D. W., Verhaert P., and Baguna J. GYIRFamide: a novel FMRFamide-related peptide (FaRP) from the triclad turbellarian, *Dugesia tigrina*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **209**, 689–697 (1995). DOI: 10.1006/bbrc.1995.1554
41. Johnston R. N., Shaw C., Halton D. W., Verhaert P., Blair K. L., Brennan G. P., Price D. A., and Anderson P. A. Isolation, localization, and bioactivity of the FMRFamide-related neuropeptides GYIRFamide and YIRFamide from marine turbellarian *Bdelloura candida*. *J. Neurochem.*, **67**, 814–821 (1996). DOI: 10.1046/j.1471-4159.1996.67020814.x
42. Rapport M. M., Green A. A., and Page I. H. Crystalline Serotonin. *Science*, **108** (2804), 329–330 (1948).
43. Gustafsson M. K., Fagerholm H. P., Halton D. W., Hanzelová V., Maule A. G., Reuter M., and Shaw C. Neuropeptides and serotonin in the cestode, *Proteocephalus exiguus*: an immunocytochemical study. *Int. J. Parasitol.*, **25** (6), 673–682 (1995). DOI: 10.1016/0020-7519(94)00169-0
44. Tolstenkov O., Terenina N., Kreshchenko N., and Gustafsson M. The pattern of FMRFamide and serotonin immunoreactive elements in the nervous system of *Aspidogaster conchicola* K. Baer, 1827 (Aspidogastrea, Aspidogastreae). *Belgian J. Zool.*, **144**, 133–136 (2010).
45. Плотникова С. И. и Кузьмина Л. В. Распределение нервных элементов, содержащих биогенные амины, у представителя плоских червей — молочно-белой планарии *Dendrocoelum lacteum*. В кн.: *Физиология и биохимия беспозвоночных* (Л.: Наука, 1968), сс. 23–29.
46. Reuter M., Gustafsson M. K. S., Mäntylä K., and Grimmelikhuijzen C. J. P. The nervous system of Tricladida. III. Neuroanatomy of *Dendrocoelum lacteum* and *Polycelis tenuis* (Plathelminthes, Paludicola): an immunocytochemical study. *Zoomorphology*, **116**, 111–122 (1996). DOI: 10.1007/BF02526943
47. Лурье Б. Л. Моноаминсодержащие нейроны планарии *Polycelis nigra*. *Вестник МГУ. Сер. биол.*, **2**, 3–13 (1975).
48. Reuter M., Gustafsson M. K. S., Sheiman I. M., Terenina N., Halton D. W., Maule A. G., and Shaw C. The nervous system of Tricladida II. Neuroanatomy of *Dugesia tigrina* (Plaudicola, Dugesidae): an immunocytochemical study. *Invert. Neurosci.*, **1**, 133–143 (1995). DOI: 10.1007/BF02331911
49. Itoh M. T. and Igarashi J. Circadian rhythm of serotonin levels in planarians. *Neuroreport*, **11** (3), 473 (2000). DOI: 10.1097/00001756-200002280-00009
50. Fernandes M. C., Alvares E. P., Gama P., and Silveira M. Serotonin in the nervous system of the head region of the land planarian *Bipalium kewense*. *Tissue Cell.*, **35** (6), 479–486 (2003). DOI: 10.1016/s0040-8166(03)00074-0
51. Kerschbaum H., Freiblmaier K., and Pohlhammer K. Localization of 5-HT and gastrin-cck-immunoreactivity *Crenobia alpina* (Tricladida, Plathelminthes). *Fortschr. Zool.*, **36**, 177 (1988).
52. Kotikova E. A., Raikova O. I., Reuter M., and Gustafsson M. K. S. The nervous and muscular systems in the free-living flatworm *Castrella truncata* (Rhabdocoela): an immunocytochemical and phalloidin fluorescence study. *Tissue Cell.*, **34** (5), 365–374 (2002).
53. Kabotyanski E. A., Nezhlin L. P., and Sakharov D. A. Serotonin neurons in planarian pharynx. *Stud. Neurosci.*, **13**, 138–152 (1991).
54. Крешенко Н. Д. Иммуноцитохимическая идентификация серотонинергических нейронов у планарий *Girardia tigrina*. *Бiol. мембраны*, **33** (5), 353–362 (2016).
55. Cebrià F. Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: an immunocytochemical study. *Neurosci. Res.*, **61** (4), 375–384 (2008).
56. Крешенко Н. Д., Кузнецов Г. В., Митьковский Д. Е., Мочалова Н. В., Теренина Н. Б., Мовсесян С. О. Идентификация серотониновых нейронов у *Hymenolepis diminuta* и *Schmidtea mediterranea* с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (CLSM). В сб. «Науч. труды VII съезда биофизиков России» (КубГТУ, Краснодар, **1**, 2023), сс. 286–287. DOI: 10.26297/SbR6.2023.001
57. Prior D. J. and Uglem G. L. Behavioral and physiological aspects of swimming in cercariae of the digenetic trematode, *Proterometra macrostoma*. *J. Exp. Biol.*, **83**, 239–247 (1979).
58. Hrcckova G., Maule A., Velebny S., and Halton D. *Mesocestoides corti* (syn. *M. vogae*): Modulation of larval motility by neuropeptides, serotonin and acetylcholine. *Parasitology*, **124** (4), 409–421 (2002).
59. Day T. A., Bennett J. L., and Pax R. A. Serotonin and its requirement for maintenance of contractility in muscle fibres isolated from *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, **108**, 425–432 (1994).
60. Ribeiro P., Gupta V., and El-Sakkary N. Biogenic amines and the control of neuromuscular signaling in schistosomes. *Invertebr. Neuroscience*, **12** (1), 13–28 (2012).
61. Patocka N., Sharma N., Rashid M., and Ribeiro P. Serotonin signaling in *Schistosoma mansoni*: serotonin-

- activated G protein-coupled controls parasite movement. *PLoS Pathog.*, **10** (1), e1003878 (2014). DOI: 10.1371/journal.ppat.1003878
62. Sakharov D. A., Golubev A. I., Malyutina L. V., Kabotyanski E. A., and Nezhlin L. P. Serotonergic control of ciliary locomotion in a turbellarian flatworm. In: *Neurobiology of invertebrates: transmitters, modulators and receptors*, Ed. by J. Salanki and K. S. Rózsa (Budapest, Akadémiai Kiadó, 1988), pp. 479–491.
 63. Franquinet R. The role of serotonin and catecholamines in the regeneration of the Planaria *Polycelis tenuis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **51**, 85–95 (1979).
 64. Шейман И. М., Крещенко Н. Д. и Нетребва М. В. Формирование функции фоторецепторной системы на ранних этапах развития. *Биофизика*, **55** (4), 680–685 (2010).
 65. Крещенко Н. Д., Гребенщикова Е. В. и Карпов А. Н. Влияние серотонина на регенерацию фоторецепторов планарий. В кн.: *Сб. науч. статей по мат. межд. науч. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями»* **20**, 278–283 (2019). DOI: 10.31016/978-5-9902340-8-6.2019.20
 66. Lambrus B. G., Cochet-Escartin O., Gao J., Newmark P. A., Collins E. M., and Collins J. J. Tryptophan hydroxylase is required for eye melanogenesis in the Planarian *Schmidtea mediterranea*. *PLoS One*, **10**, e0127074 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0127074

Morphometric Analysis of Serotonergic Structures in the Nervous System of Planarian *Schmidtea mediterranea*

G.V. Kuznetsov*, D.E. Mitkovskii**, and N.D. Kreshchenko*

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

** Serpukhov college, Centralnaya ul. 154, Serpukhov, Moscow Region, 142207 Russia

The nervous system of planarians includes cerebral ganglia situated in the anterior part of the body and a pair of well-defined ventral nerve cords that extend throughout the whole animal. Serotonergic components of the nervous system were determined by indirect method of immunocytochemical staining of whole mount tissue preparations of planarians *Schmidtea mediterranea*, followed by analysis using a fluorescence microscope. The results obtained show the presence of serotonergic components in the central and peripheral parts of the nervous system of planarians *S. mediterranea*. The morphological parameters of serotonin-immunopositive structures were estimated, as well as neuron counts in the cerebral ganglion were done. The measurements were carried out on micrographs taken through a digital camera from stained whole mount preparations. The size of serotonin neurons in three areas of the body, the thickness of the nerve trunks and cerebral ganglion, and the distance between the nerve cords and transversal commissures were taken into consideration. For the first time, the new quantitative data were obtained characterizing the morphological properties of the nervous system of planarian *S. mediterranea*. Also, the observation of the eyes regeneration in planarians in response to decapitation and exposure to serotonin was performed. It was found that exogenous serotonin at concentrations of 0.01–1 μM accelerated eye differentiation during the regeneration of the head end of *S. mediterranea* planarian.

Keywords: fluorescent microscopy, planarian, nervous system, serotonin, morphometry, regeneration