

УДК 616.74; 591.86; 591.169; 591.473.2

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ВРЕМЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОЦЕССА РЕГЕНЕРАЦИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У ПЛАНАРИЙ *Polycelis tenuis* (Platyhelminthes)

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

\*Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: Mansurg999@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.02.2024 г.

После доработки 14.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

С помощью гистохимической окраски тотальных препаратов флуоресцентно-меченным фаллоидином, окрашивающим мышечные клетки за счет необратимого связывания с актиновыми филаментами, методом флуоресцентной микроскопии изучена мускулатура тела планарий *Polycelis tenuis* (Turbellaria, Platyhelminthes). Показано, что мускулатура стенки тела содержит кольцевые, диагональные и продольные мышечные волокна. Кольцевые волокна наиболее тонкие и плотно расположены в наружном слое мускулатуры. Продольные волокна толстые, собраны в пучки. Отдельные диагональные мышечные волокна находятся на существенном расстоянии, в двух направлениях и под углом друг другу. Рассмотрен процесс регенерации мышечной ткани у *P. tenuis* после резекции головного конца животного. Изучение регенерации проводилось в динамике, животные отобраны на 3, 5, 7, 10 и 13 сутки после операции. По результатам микроскопического исследования сделан вывод об основных этапах регенерации мышечной ткани и их характерных чертах. Показано, что мышечная система *P. tenuis* имеет высокий приоритет и скорость регенерации и восстанавливается в течение 10–13 суток.

**Ключевые слова:** планарии, *Polycelis tenuis*, мускулатура, гистохимия, фаллоидин, флуоресцентная микроскопия.

**DOI:** 10.31857/S0006302924060148, **EDN:** NKLBTN

Планарии обладают крайне высокими регенеративными способностями. Несмотря на сравнительно примитивное строение (наличие только нескольких специализированных систем: кожно-мышечный мешок, нервная система, разветвленный замкнутый кишечник; в зависимости от вида, возможно наличие специализированных половых структур), планарии широко используются для изучения процессов регенерации [1, 2]. Планарии являются классическим модельным объектом для изучения регенерации и биологии стволовых клеток. Эти животные также используются в качестве удобного объекта для изучения регенерации и биологии стволовых клеток студентами [2, 3]. Однако данные о потенциальной и фактической способности к регенерации разных частей тела планарии фрагментарны и часто противоречивы.

Регенерация у планарий происходит по эпиморфному типу, характерному для регенерации утраченных структур многих анатомий (например, аннелид). Эпиморфный тип регенерации заклю-

чается в образовании на месте ранения регенерационной бластемы – скопления стволовых клеток, которые, последовательно проходя стадии деления, роста и дифференцировки, замещают утраченную структуру [2, 4]. Регенерационная способность обеспечивается наличием у планарий пула особых плuriпотентных стволовых клеток, называемых необластами [4, 5]. Дифференцировка стволовых клеток бластемы регулируется как основными генетическими факторами клеточной регуляции (такими, как H3 Ser10 (H3P), PCNA и т.д.) [6], так и специфическими факторами регуляции дифференцировки необластов, выявленными за последние 20 лет направленного исследования (*tgs-1*, *zfp-1*, *vasa*, *bruli* и т.д.) [5].

Мышечная ткань – одна из наиболее хорошо развитых биологических систем у плоских червей, наравне с нервной и пищеварительной. У представителей плоских червей мышечная система представляет собой замкнутый кожно-мышечный мешок, строение которого значительно

усложнено по сравнению со строением такового у кишечнополостных животных. Практически все плоские черви обладают схожим типом строения кожно-мускульного мешка. Он состоит из трех слоев: наружный слой кольцевой мускулатуры, внутренний слой продольной мускулатуры и соединяющий их слой диагональной мускулатуры, осуществляющий процесс синхронизации движений кольцевой и поперечной мускулатуры [7, 8]. В зависимости от образа жизни и типа среды обитания (свободноживущие или паразитические виды; пресноводные или морские виды; различные ареалы обитания) линейные размеры и степень развития определенных слоев кожно-мускульного мешка у разных видов может отличаться [9–11].

Данные о морфологии мускулатуры планарий немногочисленны. Так, имеются сведения в отношении планарий *Girardia tigrina* [12], *Schmidtea mediterranea* [13] и *Dugesia japonica* [14]. У некоторых планарий исследователи выделяют дополнительный слой мускулатуры, как, например, у *G. tigrina*. Согласно результатам исследований, дополнительный слой мускулатуры является дублированным слоем продольной мускулатуры [12].

Строение мышечной системы планарий изучали еще в конце XX века. Основными методами исследования строения мышечной системы плоских червей – являлись методы световой микроскопии, и общая окраска срезов тканей базовыми гистологическими красителями, такими как гематоксилин и эозин, а также методы электронной микроскопии [15, 16]. Посредством данных методов были получены базовые сведения о строении мускулатуры планарий таких видов, как *Girardia tigrina* и *Dugesia dorotocephala*.

Более современным и информативным методом стал метод флуоресцентной и/или конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с использованием специфической гистохимической окраски фаллоидином, несущим флуоресцентную метку, для окрашивания мышечной ткани [17, 18]. Использование данной окраски позволило изучать в конфокальном лазерном сканирующем микроскопе тотальные препараты планарий, и сразу получать данные по всей толщине ткани животного, не требующие трудоемкой трехмерной реконструкции.

Мускулатура играет важную роль в жизни плоских червей, как свободноживущих, так и паразитических. Мышечная система принимает участие в локомоции животного; в поглощении пищи и продвижении ее по пищеварительной системе; в процессах полового и бесполого размножения. У паразитических форм плоских червей мускулатура играет важную роль в удерживании животного в организме хозяина. Кроме того, по-

скольку плоские черви лишены наружного скелета, мускульный мешок также способствует поддержанию формы животного и защите нервной ткани и пищеварительной системы от повреждающих факторов внешней среды [18, 19].

Задачей данного исследования стало изучение процесса регенерации мышечной ткани в головном отделе тела после декапитации планарий *P. tenuis* (Turbellaria, Planariidae), вида, не изученного ранее в этом отношении. Был рассмотрен темп регенерации мышечной ткани в бластеме планарий, а также сделаны предварительные выводы о причинах и следствиях наблюдаемого процесса регенерации мышечной ткани у планарий *P. tenuis*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культура планарий.** Исследование проводилось на планариях вида *P. tenuis*, семейства *Polycladidae*. Данный вид планарий относится к половым видам и имеет много глаз на фронтальном конце тела. Средний размер отобранных для эксперимента особей составляет 0.5 см. На протяжении 1 месяца животных держали в пластиковом контейнере со смесью водопроводной и дистиллированной воды (2 : 1) в полутемных условиях при температуре 19–21°C, в этих же условиях проводили опыты. Планарий кормили мотылем два раза в неделю. За неделю до начала эксперимента (резекция головного отдела) животные перестали получать пищу.

**Дизайн исследования.** Для проведения исследования животные были разделены на 5 групп, после чего была проведена резекция головного отдела планарий. На 3, 5, 7, 10 и 13 сутки регенерации из общего пула животных было отобрано по 7 особей. Дополнительно была отобрана контрольная группа (8 особей) неповрежденных (интактных) планарий с целью проведения дальнейшего визуального сравнения степени регенерации поврежденного участка у подопытных животных. Отобранные особи подвергались фиксации в параформальдегиде; после чего – окраске красителем фаллоидином, предназначенным для визуализации мышечной ткани при флуоресцентной микроскопии. Готовые препараты изучали методом флуоресцентной микроскопии; были сделаны изображения участка регенерационной бластемы планарий *P. tenuis* и, исходя из этих изображений, описан процесс регенерации планарий и сделаны выводы о его особенностях.

**Сущность метода.** Для изучения особенностей мышечной ткани планарий был применен фаллоидин, меченный флуоресцентным зондом. Фаллоидин связывается с актином клетки в его полимерной форме и препятствует его деполимеризации [17, 20]. Молекула фаллоидина, пред-

ставляющего собой бициклический гептапептид, связывается с актиновыми филаментами гораздо сильнее, чем с мономерным актином, так как встраивается в интерфазы между двумя актиновыми субъединицами. Свойство фаллоидина специфически связываться с актиновыми микрофиламентами широко используется в клеточной биологии. Фаллоидин, меченный флуоресцентным красителем, применяется для окрашивания актиновых микрофиламентов в живых и фиксированных клетках для последующего микроскопического анализа. Эффективность применения фаллоидина для изучения мышечных структур плоских червей была подтверждена ранее [18, 21, 22].

**Гистохимия.** Особи планарий *P. tenuis* были зафиксированы в 4%-м растворе параформальдегида (MP Biomedicals, США) под покровным стеклом в течение 1 ч при комнатной температуре (20°C). Затем образцы были перенесены в пробирки типа «эппendorф» объемом 1.5 мл, наполненные свежим раствором параформальдегида, и инкубировались на протяжении 3.5 ч при температуре 4°C. По истечении времени инкубирования, образцы переносились в фосфатно-солевой буфер (ООО «Компания Хеликон», Россия) на 24 ч с целью избавиться от возможного загрязнения. Затем образцы помещались в пробирки типа «эппendorф» с раствором фаллоидина (1 : 200, Sigma, США) на 2 ч при комнатной температуре. По завершении времени окрашивания фаллоидин удаляли из пробирок. Далее в пробирки вносили фосфатно-солевой буфер на 10 мин с целью отмыть препарат от избытка красителя. Через 10 мин буфер сливали. Данный цикл повторяли трижды. После этого планарий помещали по одной особи на предметные стекла, заключали в каплю (~60 мкл) 75%-го глицерина и накрывали покровным стеклом.

**Микроскопия.** Готовые образцы просматривали с помощью флуоресцентного микроскопа DM600B (Leica, Германия), оснащенного цифровой камерой DC300F (Leica, Германия). Для обнаружения фаллоидина был применен флуоресцентный фильтр N2.1 (спектр возбуждения 515–560 нм, спектр испускания 590 нм). Изображения были сохранены в формате TIFF с высоким разрешением. Морфологические измерения проводили на микрофотографиях, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа, с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США). С целью изучения формы бластемы, ее площади и степени интенсивности регенерационных процессов в целом образцы были подвергнуты микроскопии в светлом поле. Подготовка иллюстраций была осуществлена при помощи программы Adobe Photoshop C6 (Adobe Corp., США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

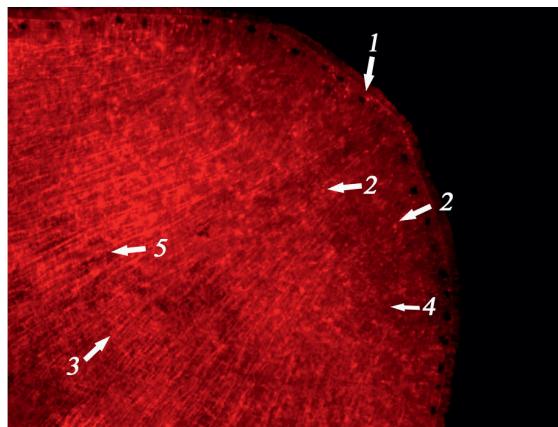
Окрашивание фаллоидином позволило визуализировать актиновые миофиламенты стенки тела планарии, а также имеющие сродство к фаллоидину компоненты ее внутренней среды и участка бластемы.

**Неповрежденная (интактная) планария.** Все клетки и структуры мышечной системы головного конца планарии имеют одинаковую интенсивность окраски, что говорит о том, что жизнедеятельность клеток мускулатуры планарий протекает нормально. Мышечные клетки резко выделяются на фоне внутренней среды планарии, что позволяет составить схему организации мускулатуры головного конца планарии. Исследование тотальных препаратов показало наличие в стенке тела планарий трех выраженных слоев мускулатуры – наружного слоя регулярно расположенных тонких кольцевых волокон, внутреннего слоя толстых продольных мышечных волокон и слоя диагональных волокон, расположенных между продольным и кольцевым мышечными слоями (рис. 1, структуры 2 и 4). Такое строение соматической мускулатуры тела характерно для различных участков тела планарии.

По изображению мускулатуры головного конца неповрежденной (интактной) планарии *P. tenuis* (рис. 1) проводили сравнение степени восстановления мышечной ткани в головном конце планарии путем сопоставления изображений в определенные дни регенерации.

**Регенерация мускулатуры головного конца тела планарий *P. tenuis*. День 3** (рис. 2а). На 3 сутки в районе резекции, на раневой поверхности планарии, наблюдается отсутствие четко окрашенных фаллоидином мышечных клеток либо клеток-предшественниц мышечной ткани. Несмотря на это, вблизи участка раневой поверхности со стороны неповрежденного участка тела животного обнаруживаются скопления слабо окрашенных (по сравнению с неповрежденным участком тела планарии) фаллоидином клеток. Предположительно, это – пул необластов, готовящихся к стадии дифференцировки по пути клеток мышечной ткани.

**День 5** (рис. 2б). В области бластемы клетки окрашиваются фаллоидином крайне интенсивно, а их общее число значительно увеличивается. Это может говорить о процессах деления необластов и их дифференцировки в миобласты. Миобластами называются необласти, начавшие дифференциацию, приводящую в дальнейшем к специализации в клетки мышечной ткани, но находящиеся еще на самом раннем этапе этой клеточной линии. На некоторых препаратах отчетливо видны миофибрillоподобные структуры – так называемые «направляющие оси», которые начинаются от неповрежденного участка



**Рис. 1.** Головной конец неповрежденной (интактной) планарии *Polycelis tenuis*, и его мускулатура. Обозначения: 1 – глаз планарии; 2 – клетки мышечной ткани, равномерно окрашенные и демонстрирующие нормальную жизнедеятельность; 3 – продольные волокна кожно-мускульного мешка планарии; 4 – внутренняя среда планарии; 5 – фрагмент «кольца» наружного слоя кожно-мускульного мешка планарии.

планарии, на границе с бластемой, и делятся на протяжении большей части бластемы, сходясь в одной точке, расположенной в районе бластемы (рис. 3а). Роль «направляющих осей» предположительно заключается в создании каркаса для регенерации мышечной ткани – в направлении протяженности «направляющих осей» происходит рост популяции миобластов.

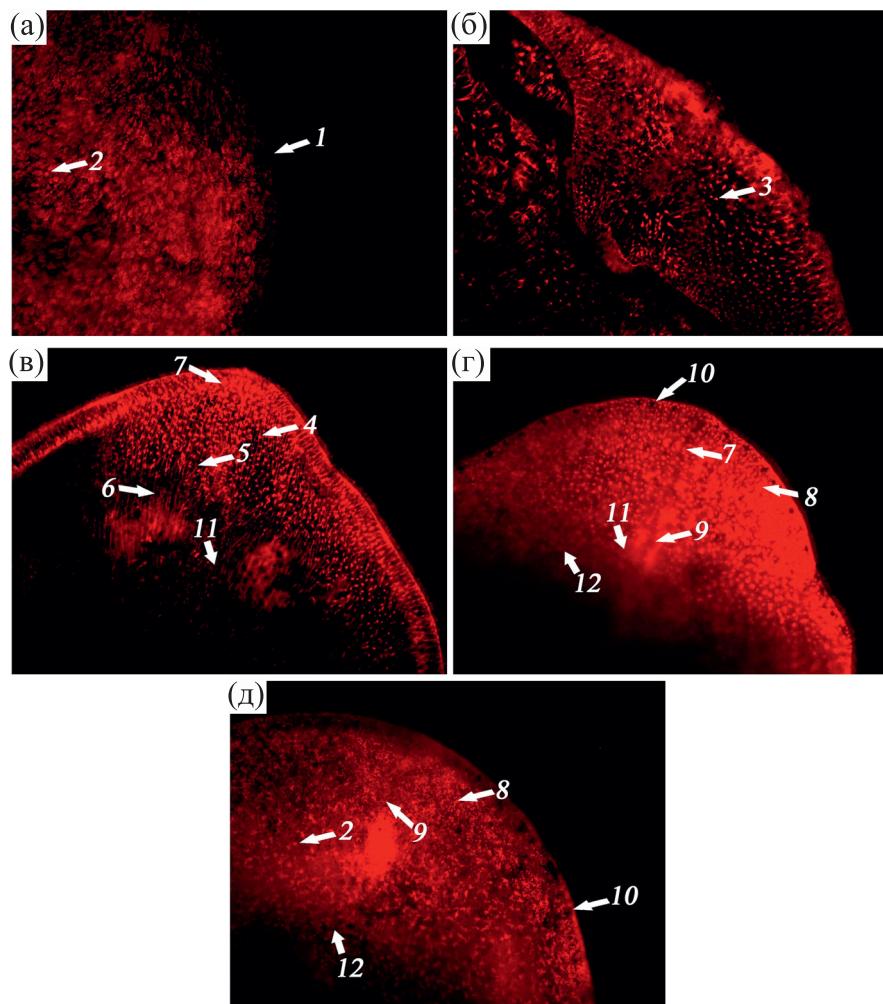
**День 7** (рис. 2в). Интенсивность окраски мышечных структур (как клеток, так и «направляющих осей») достигает своего пика, что говорит о крайне высокой интенсивности протекающих в данных структурах биологических процессах и повышенном формировании актина в ткани. Отчетливо видны плотно сконцентрированные в районе бластемы миобlastы, интенсивность окраски которых резко контрастирует, будучи более высокой по сравнению с окраской мышечной ткани в неповрежденном участке планарий (рис. 3б). Закладка мышечной ткани в области бластемы практически завершена на этом этапе регенерации. Однако до сих пор сохраняются «направляющие оси», поддерживающие направление роста миобластов. На некоторых препаратах обнаруживаются слабо окрашиваемые паттерны внутреннего слоя мускулатуры (продольной) – очевидно, внутренний слой полноценного кожно-мускульного мешка планарии восстанавливается раньше его остальных компонентов. Видны зачатки регенерирующих глаз.

**День 10** (рис. 2г). На 10 сутки «направляющие оси» теряют интенсивность окраски по сравнению с предыдущими днями и остальными клетками бластемы. Предположительно, они расслаиваются в связи с завершением процесса дифференциации миобластов в бластеме и их трансформации в клетки мышечной ткани (рис. 3в). Новообразованные клетки мышечной

ткани, переходят к завершающему этапу трансформации в зрелые клетки мышечной ткани, что видно, исходя из потери ими интенсивности окраски фаллоидином, и приближении их к окраске мышечных клеток в неповрежденном участке тела планарии. В то же время повышается интенсивность окраски внутреннего (продольного) слоя мышечной системы планарии; обнаруживаются окрашиваемые «кольца» внешнего (кольцевого) слоя мышечной системы, а также соединяющие эти два слоя короткие волокна диагональных миофibrил. На световой микроскопии наблюдается начало дифференцировки тканей внутренней среды в регенерационной бластеме планарии (рис. 4а). Отчетливо видны восстановившиеся глаза.

**День 13** (рис. 2г). На 13 сутки при окрашивании фаллоидином различия в интенсивности окрашивания клеток мышечной ткани между участком бластемы и неповрежденным участком тела планарии почти не наблюдаются. Это может говорить о практически полном завершении процесса регенерации мышечной ткани в бластеме планарии, выражаясь в завершении дифференцировки миобластов (рис. 3г). Четко окрашены восстановленные слои мышечной системы планарий, как внутренние продольные, так и наружные кольцевые мышцы. Несмотря на это, при микроскопии в светлом поле, бластема все еще отчетливо выделяется; хорошо виден интенсивный процесс полного восстановления тканей внутренней среды (кишечник). Отчетливо видны восстановленные глаза, расположенные по переднему краю регенерационной бластемы (рис. 4б).

Изучение регенерационных способностей планарий проводилось с начала XX века [23, 24], однако сложные гистологические и цитологиче-

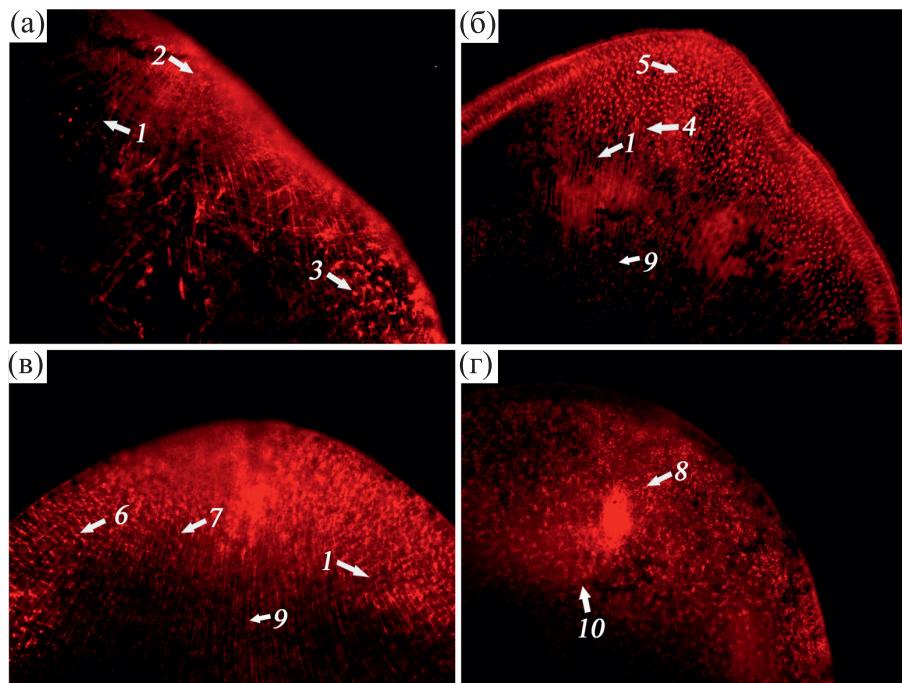


**Рис. 2.** Динамика образования и развития регенерационной бластемы на раневой поверхности планарии *Polycelis tenuis* после резекции головного конца (окраска фаллоидином): (а) – 3-и сутки регенерации, (б) – 5-е сутки регенерации, (в) – 7-е сутки регенерации, (г) – 10-е сутки регенерации, (д) – 13-е сутки регенерации. Обозначения: 1 – раневая поверхность; 2 – мышечные клетки неповрежденного участка тела планарии; 3 – клетки-предшественники, приступившие к интенсивной трансформации в мышечные клетки; 4 –proto-мышечные клетки, характеризующиеся активной жизнедеятельностью; 5 – мигрирующие по «направляющим осям» клетки-предшественницы; 6 – волокна мышечной ткани тела планарии; 7 – завершающие окончательную дифференцировку клетки мышечной ткани; 8 – восстановившиеся мышечные клетки; 9 – остатки распавшихся вспомогательных структур; 10 – восстановившийся глаз планарии; 11 – продольные волокна внутреннего слоя мускулатуры; 12 – «кольца» наружного слоя мускулатуры.

ские исследования стали возможны только с развитием соответствующих методов и разработке гистологических, гистохимических и иммуноцитохимических красителей к различным биохимическим компонентам тканевых структур [13, 16, 25–27]. Изучение регенерации мышечной системы у нескольких видов планарий, а именно, у *G. tigrina* и, реже, у *S. mediterranea*, активно проводилось в период с 1980 до 2000 годов. Наиболее полные и точные исследования проводились на *S. mediterranea* и *G. tigrina*, результатом этих работ стали сведения о строении мускулатуры планарий данного вида, а также установление темпов и порядка их восстановления при повреждении.

Согласно полученным данным [12, 13, 28], миофibrиллы планарий организуются в узнаваемые мускульные паттерны, присущие неповрежденным червям *S. mediterranea* к концу четвертых – началу пятых суток регенерации. Начиная с 2010 годов приоритет в исследовании регенерации плоских червей смещается в сторону генетических основ регенерации планарий [29–31].

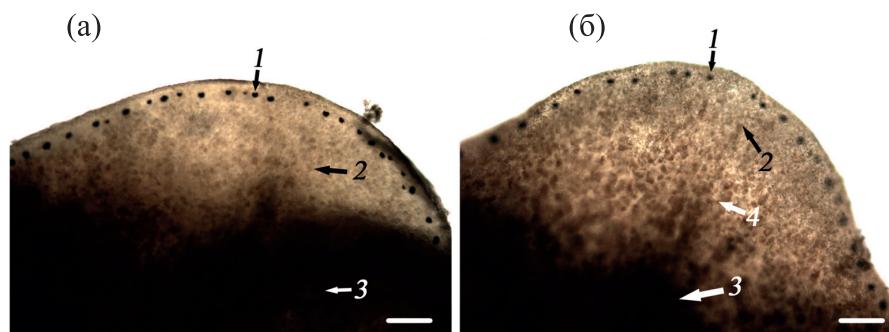
Исследования особенностей строения и регенерации мышечной системы плоских червей вида *P. tenuis* до настоящего времени не проводились. Проведенное нами исследование является гистохимическим изучением процесса регенерации планарий *P. tenuis* в динамике на тотальных пре-



**Рис. 3.** Вспомогательные структуры в процессе регенерации головного конца планарии *Polycelis tenuis*, и динамика их развития: (а) – 5-е сутки регенерации, (б) – 7-е сутки регенерации, (в) – 10-е сутки регенерации, (г) – 13-е сутки регенерации. Обозначения: 1 – «направляющая ось», миофибрильный тяж; 2 – «центр схождения», к которому устремляются «направляющие оси»; 3 – клетки-предшественники, приступившие к интенсивной трансформации в мышечные клетки; 4 – мигрирующие по «направляющим осям» клетки-предшественницы; 5 –proto-мышечные клетки, характеризующиеся активной жизнедеятельностью; 6 – завершающие окончательную дифференцировку клетки мышечной ткани; 7 – начавшие распадаться «направляющие оси»; 8 – остатки распавшихся вспомогательных структур, 9 – продольные волокна мускулатуры, 10 – диагональные волокна.

паратах плоских червей. Результатом исследования стало установление сроков регенерации мускулатуры тела в головном конце планарий *P. tenuis*, а также порядка восстановления разных слоев мускулатуры. Обнаружено, что регенерация мускулатуры в головном конце *P. tenuis* до исходного состояния занимает приблизительно 10–13 суток (при 20°C); причем восстановление происходит, начиная с внутреннего (продольного)

слоя мускулатуры, на котором в дальнейшем проходит наращивание наружного (кольцевого) и соединяющего (диагонального) слоев мускулатуры. Полученные результаты характеризуются полнотой и позволяют провести сравнительный анализ с результатами аналогичных исследований, проведенных на планариях других видов. Например, в работе [13] также рассмотрен процесс регенерации мускулатуры головного конца



**Рис. 4.** Световая микроскопия финальных дней регенерации головного конца планарий *Polycelis tenuis*: (а) – 10-е сутки регенерации, (б) – 13-е сутки регенерации. Обозначения: 1 – восстановленные глаза, 2 – регенерационная бластема, 3 – неповрежденный участок тела планарии, 4 – восстановление внутренней среды планарии на участке бластемы. Масштаб 100 мкм.

*S. mediterranea* с указанием темпов процесса регенерации. Путем сопоставления результатов данной работы и полученных нами результатов, можно сделать вывод, что регенерация мышечной ткани у планарий *P. tenuis* протекает по такому же паттерну, что и регенерация мышечной ткани у планарий *S. mediterranea*. Однако, в отличие от *S. mediterranea*, восстановление мускулатуры у *P. tenuis* происходит медленнее, 10–13 суток против 7–10 суток.

Полученные результаты, а также их сопоставление с уже имеющимися сведениями о процессе регенерации мускулатуры планарий указывают на то, что, несмотря на различную степень родства и особенности физиологии у планарий (половой или бесполый способ размножения), процессы регенерации протекают у всех исследованных видов червей по единой схеме. Наши данные дополняют имеющиеся литературные сведения в отношении других видов что в дальнейшем позволит выработать единую теорию регенерации плоских червей, упрощающую понимание регенерации как биологического явления с позиции гистологии и цитологии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что процесс регенерации мышечной ткани планарий вида *Polycelis tenuis* при температуре 20°C занимает от 10 до 13 суток; процесс регенерации тканей внутренней среды занимает больше времени. В первую очередь происходит восстановление тканей и органов, критически важных для ориентации в пространстве (глаза, нервные ганглии) и локомоции (мышечные ткани). Окрашиваемые фаллоидином клетки-предшественники мышечной ткани видны на флуоресцентном микроскопе уже на 5-е сутки регенерации, однако их метки становятся полностью идентичными клеткам сомы планарии только после 10–13 суток. Наблюдаемая скорость восстановления мышечной ткани и, очевидно, высокий приоритет ее восстановления в ходе регенерации, согласуется с описанными ранее исследованиями процесса регенерации плоских червей.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность сотруднику Института биофизики клетки РАН В.А. Яшину за помощь в работе с флуоресцентным микроскопом. В работе было использовано оборудование Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (Пущино, Россия).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования проводились в рамках Государственного задания № 075-00609-24-01.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Шейман И. М., Крещенко Н. Д. и Нетреба М. В. Процесс регенерации у планарий разных видов. *Онтогенез*, **41** (2), 114–119 (2010).
- Тирас Х. П., Петрова О. Н., Мякишева С. Н. и Асланиди К. Б. Формирование регенерационной бластемы у планарии *Girardia tigrina*. *Фундаментальные исследования*, **7**, 493–500 (2015). EDN: UEAHIF
- Никанорова Д. Д., Купряшова Е. Е. и Костюченко Р. П. Регенерация у аннелид: клеточные источники, тканевые перестройки и дифференциальная экспрессия генов. *Онтогенез*, **51** (3), 177–192 (2020). DOI: 10.31857/S0475145020030040
- Rink J. C. Stem cell systems and regeneration in planaria. *Dev. Genes Evol.*, **223**, 67–84 (2013). DOI: 10.1007/s00427-012-0426-4
- Bowen D., den Hollander J. E., and Lewis G. H. J. Cell death and acid phosphatase activity in the regenerating planarian *Polycelis tenuis*. *Differentiation*, **21**, 160 (1982).
- Molina M. D. and Cebrià F. Decoding stem cells: an overview on Planarian stem cell heterogeneity and lineage progression. *Biomolecules*, **11** (10), 1532 (2021). DOI: 10.3390/biom11101532
- Mair G. R., Maule A. G., Shaw C., and Halton D. W. Muscling in on parasitic flatworm. *Parasitol. Today*, **14** (2), 73–76 (1998). DOI: 10.1016/s0169-4758(97)01182-4
- Kreshchenko N. D. Some details on the morphological structure of planarian musculature identified by fluorescent and confocal laser-scanning microscopy. *Biophysics*, **62** (2), 271 (2017).
- Reuter M., Mäntylä K., and Gustafsson M. K. S. Organization of the orthogen – main and minor nerve cords. *Hydrobiologia*, **383**, 175–182 (1998). DOI: 10.1023/A:1003478030220
- Mair G. R., Maule A. G., Day T. A., and Halton D. W. A confocal microscopical study of the musculature of adult

- Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, **121**, 163–170 (2000).  
DOI: 10.1017/s0031182099006174
11. Tolstenkov O. O., Prokofiev V. V., Terenina N. B., and Gustafsson M. K. S. The neuro-muscular system in *Cercaria* with different patterns of locomotion. *Parasitol. Res.*, **108**, 1219–1227 (2011). DOI: 10.1007/s00436-010-2166-6
  12. Cebria F., Vispo M., Bueno D., Carranza S., Newmark P., and Romero R. Myosin heavy chain gene in *Dugesia (G.) tigrina*: A tool for studying muscle regeneration in planarians. *Int. J. Dev. Biol., Suppl.* **1**, 177S–178S (1996). PMID: 9087750
  13. Cebria F. and Romero R. Body-wall muscle restoration dynamics are different in dorsal and ventral blastemas during planarian anterior regeneration. *Belg. J. Zool.*, **131** (1), 5–9 (2001).
  14. Orii H., Ito H., and Watanabe K. Anatomy of the planarian *Dugesia japonica* I. The muscular system revealed by antisera against myosin heavy chains. *Zoolog. Sci.*, **19** (10), 1123–1131 (2002). DOI: 10.2108/zsj.19.1123
  15. Morita M., Best J. B., and Noel J. Electron microscopic studies of planarian regeneration. I: Fine structure of neoblasts in *Dugesia dorotocephala*. *J. Ultrastructure Res.*, **27**, 7 (1969). DOI: 10.1016/S0022-5320(69)90017-3
  16. *Planarian Regeneration: Methods and Protocols*. Ed. by J. C. Rink (Methods Mol. Biol., Vol. **1774**, 2018). DOI: 10.1007/978-1-4939-7802-1
  17. Wulf E., Debaben A., Bautz F. A., Faulstich H., and Wieland T. Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76** (9), 4498–4502 (1979). DOI: 10.1073/pnas.76.9.4498
  18. Maule A. G., Mair G. R., and Halton D. W. The neuromuscular system of the sheep tapeworm *Moniezia expansa* Invertebrate Neuroscience, **20**, 17 (2020). DOI: 10.1007/s10158-020-00246-2
  19. Krupenko D. Y. Muscle system of *Diplodiscus subclavatus* (Trematoda: Paramphistomida) cercariae, pre-ovigerous, and ovigerous adults. *Parasitol. Res.*, **113**, 941 (2014). DOI: 10.1007/s00436-013-3726-3
  20. Pascolini R., Panara F., Di Rosa I., Fagotti A., and Lorvik S. Characterization and fine-structural localization of actin-and fibronectin-like proteins in planaria (*Dugesia lugubris* s. l.). *Cell Tissue Res.*, **267**, 499 (1992). DOI: 10.1007/BF00319372
  21. Крещенко Н. Д. Изучение роли серотонина в мышечной функции у планарий. *Бiol. мембрany*, **37** (1), 34–44 (2020). DOI: 10.31857/S0233475520010065
  22. Толстенков О. О., Теренина Н. Б., Шалаева Н. М. и Гайворонская Т. В. Организация мышечной системы и распределение NO-ergicеских и серотонинергических элементов у trematod *Allocreadium isoporum* Looss, 1894 (Allocrediidae) и *Paramphistomum cervi* Zeder 1790 (Paramphistomatidae). *Зоология беспозвоночных*, **4** (2), 139 (2007).
  23. Salo E. and Baguna J. Regeneration and pattern formation in planarians. II. Local origin and role of cell movements in blastema formation. *Development*, **107** (1), 69–76 (1989). DOI: 10.1242/dev.107.1.69
  24. Salo E., Abril J. F., Adell T., Cebria F., Eckelt K., Fernandez-Taboada E., Handberg-Thorsager M., Iglesias M., Molina M. D., and Rodriguez-Esteban G. Planarian regeneration: achievements and future directions after 20 years of research. *Int. J. Dev. Biol.*, **53** (8–10), 1317–1327 (2009). DOI: 10.1387/ijdb.072414es
  25. Reuter M., Sheiman I. M., Gustafsson M. K. S., Halton D. W., Maule A. G., and Shaw C. Development of the nervous system in *Dugesia tigrina* during regeneration after fission and decapitation. *Invertebrate Reproduction and Development*, **29** (3), 199–211 (1996). DOI: 10.1080/07924259.1996.9672514
  26. Bueno D., Baguna J., and Romero R. Cell-, tissue-, and position-specific monoclonal antibodies against the planarian *Dugesia (Girardia) tigrina*. *Histochem. Cell. Biol.*, **107** (2), 139–149 (1997). DOI: 10.1007/s004180050098
  27. Kreshchenko N. D., Reuter M., Sheiman I. M., Halton D. W., Johnston R. N., Shaw C., and Gustafsson M. K. S. Relationship between musculature and nervous system in the regenerating pharynx in *Girardia tigrina* (Plathelminthes). *Invertebrates Reproduction and Development*, **35** (2), 109–125 (1999). DOI: 10.1080/07924259.1999.9652375
  28. Cebria F., Vispo M., Newmark P. A., Bueno D., and Romero R. Myocyte differentiation and body wall muscle regeneration in the planarian *Girardia tigrina*. *Dev. Genes Evol.*, **207** (5), 306–316 (1997). DOI: 10.1007/s004270050118
  29. Fraguas S., Barberan S., and Cebria F. EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis. *Dev. Biol.*, **354** (1), 87–101 (2011). DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.03.023
  30. Fraguas S., Barberan S., Iglesias M., Rodriguez-Esteban G., and Cebria F. egr-4, A target of EGFR signaling, is required for the formation of the brain primordia and head regeneration in planarians. *Development*, **141** (9), 1835 (2014). DOI: 10.1242/dev.101345
  31. Fraguas S., Umesono Y., Agata K., and Cebria F. Analyzing PERK activation during planarian regeneration. *Methods Mol. Biol.*, **1487**, 303–315 (2017). DOI: 10.1007/978-1-4939-6424-6\_23

## Morphological Features and Temporary Characteristics of the Process of Muscle Tissue Regeneration in Planaria *Polycelis tenuis* (Platyhelminthes)

G. V. Kuznetsov\* and N. D. Kreshchenko\*

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

A body musculature of the planarian *Polycelis tenuis* (Turbellaria, Platyhelminthes) has been investigated by fluorescence microscopy using histochemical staining of whole preparations with fluorescently-labeled phalloidin, which stains muscle cells due to irreversible binding to actin filaments. The results showed that the musculature of the body wall contains circular, diagonal and longitudinal muscle fibers. The circular fibers are the thinnest ones and densely located within the outer layer of the muscle. The longitudinal fibers are thick, gathered into bundles. Individual diagonal muscle fibers are located at a significant distance, in two directions and at an angle to each other. In the work, the process of muscle tissue regeneration in *P. tenuis* is considered after removal of the planarian's head. The current study investigates tissue regeneration on days 3, 5, 7, 10 and 13 following tissue amputation. The microscopy images provided valuable information about the main stages of muscle tissue regeneration and their characteristic features. It has been shown that the muscular system in *P. tenuis* has awesome regenerative abilities and tissue is regenerated within 10–13 days.

**Keywords:** planarian, *Polycelis tenuis*, musculature, histochemistry, phalloidin, fluorescence microscopy