

УДК 577.354

## МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭКЗОГЕННЫХ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ У ПЛАНАРИИ *Girardia tigrina* (TURBELLARIA, TRICLADIDA)

© 2019 г. Н.П. Кудикина, А.М. Ермаков\*, Э.А. Омельницкая, И.А. Скоробогатых

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, 236016, Калининград, ул. А. Невского, 14

\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: nkudikina@kantiana.ru

Поступила в редакцию 01.07.2019 г.

После доработки 01.07.2019 г.

Принята к публикации 08.07.2019 г.

Изучены морфогенетические эффекты двух экзогенных половых стероидных гормонов тестостерона и эстрадиола в ходе регенерации планарий. Наибольшей чувствительностью к введенным гормонам обладал передний регенерант, сохранивший после перерезки головной ганглий. Исследованные стероиды разнонаправлено влияли на скорость роста его бластемы: эстрадиол стимулировал, а тестостерон, наоборот, ингибировал процесс регенерации. У задних регенерантов ингибирующий эффект тестостерона сохранялся, а эстрадиол практически не влиял на скорость его восстановления. Оба гормона заметно увеличивали активность митозов в теле переднего и заднего регенерантов. Максимальные величины митотического индекса были обнаружены в зонах наиболее удаленных от среза и в непосредственной близости от него. В качестве рабочей гипотезы можно предположить, что выявленные нами особенности воздействия каждого гормона связаны с образованием специфических гормон-рецепторных комплексов и характером дисто-проксимального распределения рецепторов гормонов в теле планарий.

*Ключевые слова:* планарии, регенерация, стероидные гормоны, тестостерон, эстрадиол, необласты.

DOI: 10.1134/S0006302919050168

Понимание механизмов регенерации имеет большое значение для разных областей науки и практики, особенно для медицины, так как это позволит решить множество проблем, касающихся здоровья человека, например, при изучении нейродегенеративных заболеваний, поражающих центральную нервную систему, при разработке методов выращивания органов и тканей для трансплантации или снабжении организма стволовыми клетками, выращенными *in vivo* [1]. Изучение процессов пролиферации и дифференцировки стволовых клеток, участвующих в регенерации модельных организмов, помогает понять механизмы работы стволовых клеток у человека и позволяет изучить их связь с механизмами возникновения раковых заболеваний [2]. Кроме того, регенерация представляет собой модель эмбриогенеза и соматического роста животных, что позволяет использовать ее показатели для оценки динамики этих процессов.

Популярным модельным объектом для изучения механизмов регенерации являются свободноживущие плоские черви планарии. С точки

зрения эволюции они являются первыми животными с централизованной нервной системой и при этом обладают сравнительно простой организацией в целом [3]. Высокоразвитые восстановительные возможности планарий обеспечиваются присутствием в их теле необластов — соматических стволовых клеток. Известно, что необласты могут самообновляться и давать начало всем типам клеток планарий, включая зародышевую линию [4].

Наряду с нервной системой у плоских червей существуют два способа гуморальной регуляции различных функций организма — с помощью нейросекреторных соединений (нейропептидов), синтезируемых в разных участках нервной системы и разных групп стероидных гормонов, также имеющих эндогенную природу [5]. Результаты изучения морфогенетической функции нейросекреторных соединений показали, что экзогенные нейропептиды разной химической природы способны оказывать на регенерацию планарий весь возможный спектр воздействий — стимуляцию, торможение, а также отсутствие действия на морфогенез [6].

Данных о способности эндогенных нейрогомонов включаться в сложный механизм регуляции восстановления тканей после ампутации гораздо меньше. Известно, что динамика расхода нейросекреторных гранул синтезируемых в церебральных ганглиях планарий тесно связана с ходом восстановительного процесса, а обнаруженные нейропептиды обладают разной активностью в отношении скорости регенерации [7]. Выраженным морфогенетическим эффектом обладают и некоторые регуляторные пептиды, синтезируемые в разных тканях планарий. Эти соединения также являются частью комплексной сигнальной сети, представленной эндокринной системой [8].

Морфогенетические свойства стероидных гормонов у плоских червей мало изучены, хотя у ряда свободноживущих и паразитических червей описаны количественные профили стероидных гормонов и элементы системы их эндогенного синтеза [9–11], а также подтверждена их физиологическая значимость в организме [12].

В связи с этим целью нашего исследования стало изучение морфогенетических эффектов двух экзогенных стероидных гормонов тестостерона и эстрадиола у регенерирующих планарий *Girardia tigrina*.

Для выполнения указанной цели нами были поставлены следующие задачи:

- 1) изучение влияния экзогенных стероидных гормонов тестостерона и эстрадиола на процесс репаративной регенерации головной и хвостовой бластемы исследуемого вида;
- 2) изучение влияния экзогенных стероидных гормонов тестостерона и эстрадиола на процесс пролиферации стволовых клеток планарий – необластов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследований.** В эксперименте использовали лабораторную культуру бесполой расы планарий *Girardia tigrina* (Turbellaria, Tricladida). Животных содержали в затемненных пластиковых емкостях с «искусственной прудовой водой» (смесь водопроводной и дистиллированной воды в соотношении 2 : 1) при температуре 19–21°C. Червей кормили один раз в неделю личинками хирономид (Katrinex, Польша). Перед проведением опыта отбирали планарий длиной 9–11 мм и выдерживали голодными в течение недели.

Для оценки степени чувствительности планарий к разным концентрациям гормонов и определения рабочих концентраций проводили предварительный эксперимент. Изучали действие тестостерона в диапазоне концентраций от  $10^{-1}$  до  $10^{-3}$  мг/мл и эстрадиола в диапазоне концентраций от  $10^{-2}$  до  $10^{-5}$  мг/мл. Оценивали влияние различных концентраций гормонов на выживаемость планарий.

Растворы стандартов гормонов (Sigma-Aldrich, США) соответствующих концентраций вносили в среду содержания планарий. В дальнейшем в качестве исследуемой концентрации тестостерона использовали концентрацию  $10^{-3}$  мг/мл, рабочая концентрация эстрадиола –  $10^{-4}$  мг/мл. Контрольную группу планарий содержали в растворе водопроводной и дистиллированной воды (в соотношении 2 : 1). Экспериментальные и контрольные группы планарий состояли из 30 особей. Опыт проводили в трех независимых повторностях.

**Морфометрический анализ.** Для количественной оценки результата регенерации использовали метод прижизненной компьютерной морфометрии [13]. Для измерения площади образовавшейся бластемы и регенерирующего фрагмента изображения обрабатывали в программе Plana 4.4. Измерения проводили через каждые 24 ч в период с третьих по седьмые сутки эксперимента. В качестве количественного критерия роста использовали коэффициент регенерации  $R$ , вычисляемый по следующей формуле:

$$R = s/S, \quad (1)$$

где  $s$  – площадь бластемы,  $S$  – общая площадь регенеранта.

**Иммуногистохимический анализ.** Количественную оценку митотической активности стволовых клеток под влиянием гормонов проводили с помощью иммуногистохимического маркирования необластов. Для выявления митотических клеток в теле планарий использовали первичные антитела на фосфорилированный гистон H3 (Santa Cruz, США) в разведении 1/300 и вторичные антитела с флуоресцентным красителем FITC (Jackson ImmunoResearch, США) в разведении 1/500.

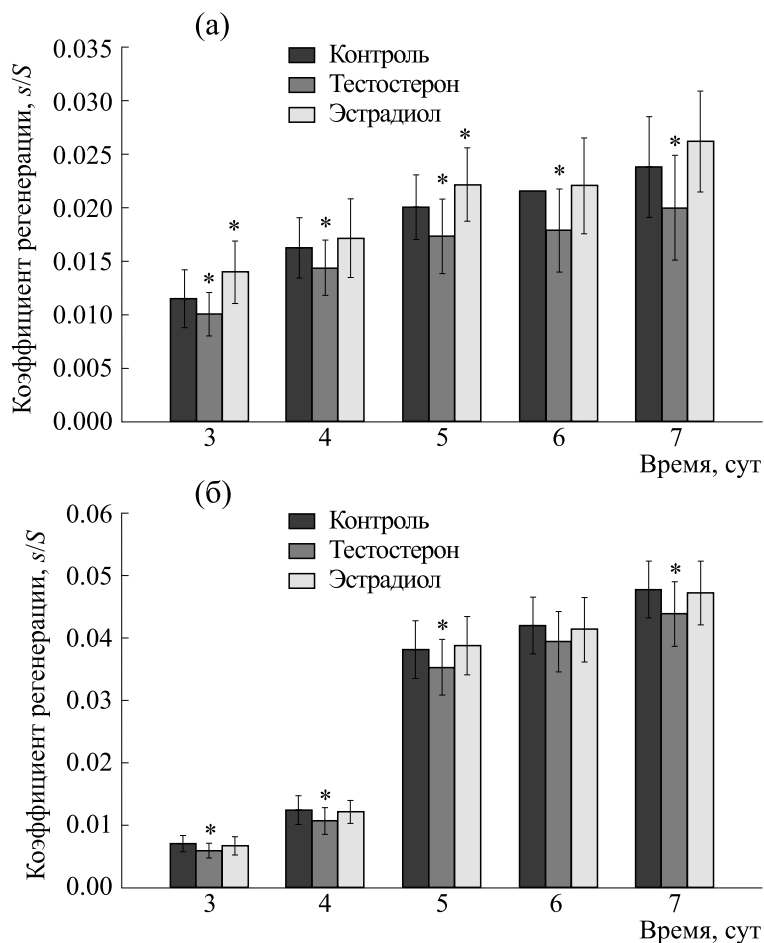
Подсчет количества митотических клеток и площади животных осуществляли с помощью программы ImageJ. Для детального изучения распределения стволовых клеток (необластов) в теле планарии и влияния гормонов на их пролиферативную активность в разных областях тела, регенерирующие животные (передний и задний регенеранты) были условно разделены на 10 равных зон вдоль переднезадней оси. В каждой зоне регенеранта подсчитывали митотическую активность делящихся клеток у планарий в контрольных и экспериментальных группах.

Для оценки митотической активности необластов использовали митотический индекс  $MI$ , который рассчитывали по следующей формуле:

$$MI = n/S, \quad (2)$$

где  $n$  – количество клеток,  $S$  – площадь регенеранта [14].

**Статистическая обработка данных.** Обработку результатов проводили в программе SigmaPlot 11 с использованием параметрического  $t$ -критерия Стьюдента для уровня значимости 0,95%. Резуль-



**Рис. 1.** Влияние тестостерона и эстрадиола на коэффициент регенерации передних (а) и задних (б) регенерантов; \* —  $p < 0,05$ .

таты представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение. Общий объем материала составил 1140 особей планарий.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Динамика изменения коэффициента регенерации переднего и заднего регенерантов под влиянием тестостерона и эстрадиола.** Внесение тестостерона в среду содержания регенерирующих планарий привело к торможению восстановительных процессов в течение всего эксперимента. Наиболее выраженное ингибирующее действие на активность роста и координацию осей тела восстанавливаемых участков было зарегистрировано в период с пятых по седьмые сутки опыта. Интенсивность воздействия тестостерона в этот период сохранялась примерно на одном уровне, но была несколько выше, чем сразу после операции: значения  $R$  у экспериментальных планарий были ниже контрольных в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ). В ходе восстановления хвостовой бластемы эстрадиол вызвал увеличение  $R$  у экспериментальных жи-

вотных уже на третьи сутки после ампутации. Величина различий  $R$  у восстанавливаемых участков животных сравниваемых групп достигла максимальной за весь исследуемый период величины (в 1,2 раза,  $p < 0,05$ ). Выраженное стимулирующее действие гормона на рост ампутированного участка зарегистрировано и на пятые сутки опыта. Численные показатели  $R$  у экспериментальных животных превышали контрольные величины в 1,1 раза ( $p < 0,05$ ). На завершающем этапе процесса регенерации (шестые-седьмые сутки) тенденция в характере воздействия эстрадиола на активность восстановительного процесса сохранялась, особенно заметно на седьмые сутки, однако выявленные различия не были значимыми (рис. 1а).

У задних регенерантов ингибирующий эффект тестостерона наблюдался в течение всего эксперимента. При этом обнаружено, что гормон в большей степени тормозил восстановление ампутированного участка на начальных этапах регенерации (третьи-четвертые сутки), по сравнению с более поздними сроками. Наибольшие различия

между показателями  $R$  у опытных и контрольных животных были обнаружены на третьи сутки после ампутации. Величина  $R$  в группе интактных планарий была больше, чем в экспериментальной группе, в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ). В дальнейшем восстановление утраченных участков тела у планарий сопровождалось резким увеличением значений коэффициента регенерации к пятым суткам как в контроле, так и в опыте. Ингибирующий характер воздействия тестостерона на величину  $R$  во второй половине опыта сохранялся, но его интенсивность снижалась. Эстрадиол, введенный после операции в среду содержания регенерирующих планарий, практически не влиял на скорость восстановления задних регенерантов: значения  $R$  у экспериментальных животных в течение всего опыта оставались на уровне контрольных значений (рис. 1б).

**Динамика изменения митотического индекса под влиянием тестостерона и эстрадиола в различных зонах передних и задних регенерантов.** Изучение характера воздействия гормонов на активность пролиферации необластов в отдельных зонах паренхимы показало, что через 24 ч в теле передних регенерантов оба гормона увеличивали митотическую активность в зонах, расположенных близко к ране. Одновременно с этим они увеличивали число делящихся необластов на участках, наиболее удаленных от раны, — зоне фоторецепторов и участке, следующем за нею. При этом количество делящихся необластов в области глотки у экспериментальных животных не менялось по сравнению с контрольными (рис. 2а). Митогенная активность тестостерона имела устойчивый характер — через 48 ч гормон по-прежнему стимулировал пролиферацию как в области раны, так и в двух названных выше участках предглоточной паренхимы. Стимулирующая активность эстрадиола на этом сроке проявлялась только в зоне расположения фоторецепторов (рис. 2б). К трем суткам наблюдения оба гормона не оказывали существенного воздействия на митотическую активность необластов (рис. 2в).

Характер воздействия гормонов на митотическую активность необластов задних регенерантов отличался от передних регенерирующих участков. Через сутки после ампутации заметное стимулирующее действие на митотическую активность оказывал только эстрадиол. Он достоверно увеличивал значение  $MI$  в паренхиме на границе с бластемой и в следующей за фоторецепторами зоне. Тестостерон стимулировал пролиферацию необластов только в зоне перед фоторецепторами (рис. 3а). Эффект гормона усиливался во времени. Через 48 ч он существенно увеличивал число делящихся необластов в области раны и на другом конце тела в зоне глаз. В это же время митогенный эффект эстрадиола проявлялся только в области раны (рис. 3б). Митогенная активность эстрадиола сохранялась дольше — на третьи сутки

опыта он стимулировал митотическую активность необластов в зоне фоторецепторов. Тестостерон не оказывал влияния на активность пролиферации стволовых клеток (рис. 3в).

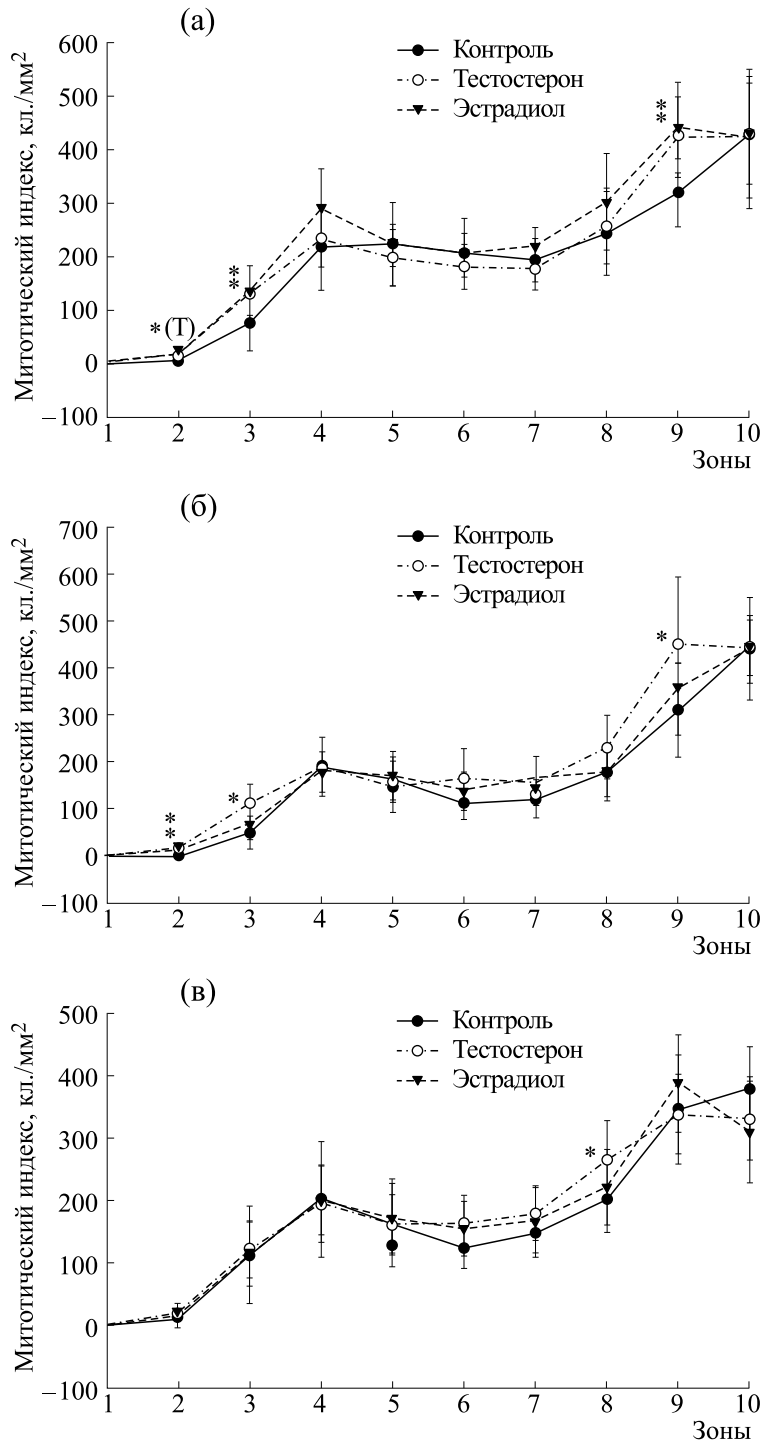
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты нашего исследования показали, что тестостерон и эстрадиол способны влиять на ход морфогенетического процесса у планарий. Характер восстановления ампутированного участка под воздействием гормонов зависел от специфики физиологической активности каждого из гормонов, а также от регенерирующего фрагмента — головного или декапитированного участка. Обнаруженный у планарий морфогенетический эффект тестостерона и эстрадиола вполне согласуется с данными о способности этих гормонов проявлять подобную активность у позвоночных животных [15,16]

Полученные нами результаты подтверждаются также литературными данными о влиянии на ход восстановительных процессов у планарий целого ряда экзо- и эндогенных соединений гормональной природы [8,17]. Данные о наличии и физиологической активности эндогенных стероидных гормонов касаются только паразитических плоских червей. Так, было показано, что введение экзогенных половых стероидов одному из представителей этой группы — ленточному червю *Taenia crassiceps* — снижало фертильность и жизнеспособность цестод, а женские половые стероиды  $17\beta$ -эстрадиол и прогестерон стимулировали скорость его роста [18]. Кроме плоских червей морфогенетические эффекты половых стероидов и других гормонов этой группы описаны у ряда беспозвоночных других таксономических групп — моллюсков и ракообразных [19,20].

Выявленные нами особенности воздействия гормонов на ход восстановления передних и задних участков тела можно объяснить, во-первых, различиями клеточного состава передних и задних регенерантов и механизмов формирования головных и хвостовых бластем [21]. Во-вторых, эти особенности, по-видимому, связаны с наличием и характером дисто-проксимального распределения рецепторов половых стероидов в клетках-мишенях разных участков тела планарий [22,23].

Оценку митогенной активности тестостерона и эстрадиола проводили с помощью иммуногистохимического маркирования необластов. Для этого использовали антитела к фосфорилированному гистону H3. Эта форма гистона является маркером перехода от фазы G2 к фазе M в клеточном цикле. Полученные нами результаты об увеличении количества делящихся необластов под воздействием гормонов позволяют предположить, что оба половых стероида сокращают продолжительность интерфазы в клеточном цикле



**Рис. 2.** Влияние тестостерона и эстрадиола на активность пролиферации неoblастов в различных зонах передних регенерантов через 24 ч (а), 48 ч (б) и 72 ч (в) после декапитации; \* –  $p < 0,05$ .

неoblастов, что приводит к увеличению числа митотически делящихся неoblастов. При этом существуют различия в интенсивности, продолжительности и динамике влияния каждого из них на этот процесс. Стойкий ингибирующий эффект

тестостерона в нашем эксперименте, возможно, связан с тем, что он в большей степени увеличивал скорость гибели клеток в процессе ремоделирования за счет апоптоза, чем пролиферацию неoblастов [24].

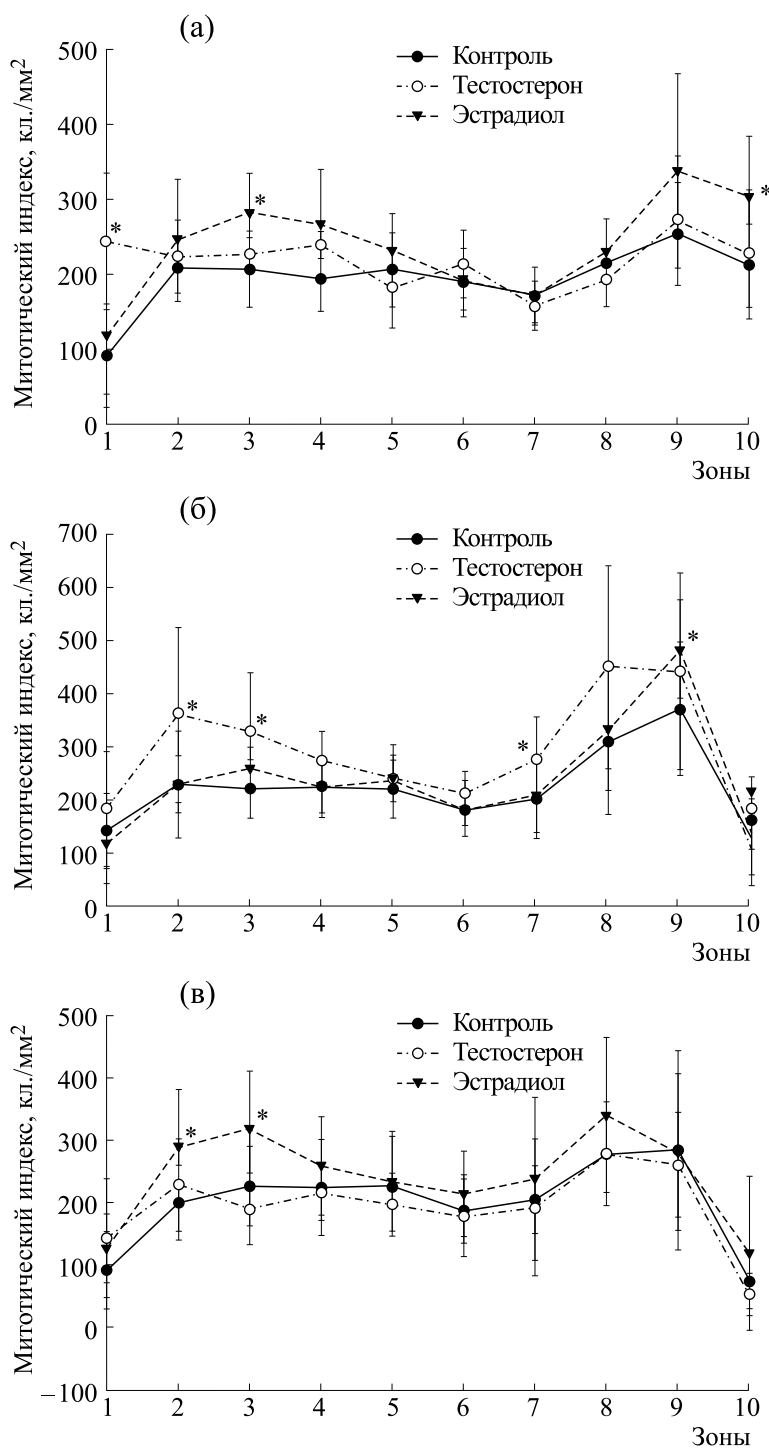


Рис. 3. Влияние тестостерона и эстрадиола на активность пролиферации необластов в различных зонах задних регенерантов через 24 ч (а), 48 ч (б) и 72 ч (в) после декапитации; \* –  $p < 0,05$ .

**ВЫВОДЫ**

1. Проведенные исследования показали, что тестостерон и эстрадиол способны влиять на ход морфогенетического процесса у планарий *Girardia tigrina* (Turbellaria, Tricladida). Экзогенно вво-

димый планариям тестостерон устойчиво ингибировал восстановительный процесс ремоделирования осей тела, как передних, так и задних регенерантов. Эстрадиол стимулировал восстановление только передних регенерантов.

2. Оба половых стероида увеличивали число делящихся необластов в паренхиме планарий. Максимальные эффекты воздействия гормонов на величину митотического индекса были обнаружены в зонах, наиболее удаленных от раны, и в непосредственной близости от нее. Интенсивность и продолжительность воздействия каждого из гормонов в передних и задних регенерантах различались.

3. Выявленные нами особенности воздействия каждого гормона, возможно, связаны с образованием специфических гормон-рецепторных комплексов и особенностями дисто-проксимального распределения рецепторов в теле планарий.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Chen, C. Liebman, P. Rabbani, et al., *Stem Cell Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Role of Imaging* (John Wiley & Sons, NY, 2017).
2. F. Marongiu, M. P. Serra, M. Fanti, et al., *Cell transplantation* **9**, 1530 (2017).
3. R. H. Roberts-Galbraith and P. A. Newmark, *Curr. Opin. Genetics & Development* **32**, 37 (2015).
4. S. J. Zhu and B. J. Pearson, *Curr. Opin. Genetics & Development* **40**, 74 (2016).
5. Н. П. Кудикина, в сб. *Материалы VI Съезда паразитологического общества «Современная паразитология — основные тренды и вызовы»* (Санкт-Петербург, 2018), с. 131.
6. Х. П. Тирас и И. М. Шейман, *Онтогенез* **15** (4), 374 (1984).
7. Н. Д. Крешенко и И. М. Шейман, *Биомедицина* **1** (1), 79 (2008).
8. Т. А. Малютина, Н. Б. Теренина и Н. Д. Крешенко, *Ученые записки Казанского ун-та* **155** (3), 129 (2013).
9. P. Jiménez, R. A. Valdez, and M. C. Romano, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **99** (4–5), 203 (2006).
10. J. M. Correia da Costa, N. Vale, M. J. Gouveia, et al., *Gene function in schistosomes: recent advances towards a cure* **5**, 9 (2014).
11. M. C. Romano, P. Jiménez, C. Miranda, et al., *Front. Neurosci.* **9**, 224 (2015).
12. W. C. Gornig and S. Keller, *J. Physiol.* **2** (4), 1 (1971).
13. Х. П. Тирас и К. Б. Асланиди, *Современные проблемы науки и образования* **6**, 515 (2016).
14. О. Н. Ермакова, А. М. Ермаков, Х. П. Тирас и др., *Онтогенез* **40** (6), 449 (2009).
15. D. Z. Mazdeh, P. Mirshokraei, M. Emami, et al., *Res. Veterinary Sci.* **118**, 11 (2018).
16. J. G. MacKrell, B. C. Yaden, H. Bullock, et al., *Nuclear Receptor Signaling* **1**, 13005 (2015).
17. Х. П. Тирас, Дис. ... д-ра биол. наук (ИТЭБ РАН, Пушкино Московской обл., 2016).
18. G. Escobedo, C. Larralde, A. Chavarria, et al., *J. Parasitology* **6**, 1235 (2004).
19. Н. П. Кудикина, *Онтогенез* **42** (3), 213 (2011).
20. Н. П. Кудикина, *Вестн. Балтийского федерального ун-та им. И. Канта. Сер.: Естественные и медицинские науки* **1**, 122 (2015).
21. Х. П. Тирас, О. Н. Петрова, С. Н. Мякишева и др., *Фундаментальные исследования* **7**, 493 (2015).
22. P. W. Reddien, *Cell* **175** (2), 327 (2018).
23. A. Belfiore and D. LeRoith, *Principles of Endocrinology and Hormone Action* (Springer, NY, 2018).
24. J. Pellettieri, P. Fitzgerald, S. Watanabe, et al., *Dev. Biol.* **338** (1), 76 (2010).

### Morphogenetic Effects of Exogenous Sex Steroid Hormones in the Planarian *Girardia tigrina* (Turbellaria, Tricladida)

N.P. Kudikina\*, A.M. Ermakov\*\*, E.A. Omelnitskaya\*, and I.A. Skorobogatykh\*

\*Immanuel Kant Baltic Federal University, ul. A. Nevskogo 14, Kaliningrad, 236016 Russia

\*\*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The morphogenetic effects of two exogenous sex steroid hormones testosterone and estradiol during planarian regeneration have been studied. The anterior regenerator which retained the head ganglion after cutting was most sensitive to the introduced hormones. Studied steroids exerted different influence on the growth rate of its blastema: estradiol stimulated and testosterone inhibited the regeneration process. In the posterior regenerants the inhibitory effect of testosterone persisted and estradiol had virtually no influence upon the rate of its recovery. Both hormones significantly increased mitotic activity in the anterior and posterior regions of the regenerants. The highest mitotic index values were observed in regions that were most remote from and in the immediate vicinity of the cutting zone. On the level of a working hypothesis it can be supposed that peculiarities of the effect of each hormone were related to the formation of specific hormone-receptor complexes and the distribution pattern of hormone receptors in the proximal and distal regions of the planarian body.

*Keywords:* planarian, regeneration, steroid hormones, testosterone, estradiol, neoblasts