

## НЕКОТОРЫЕ ДЕТАЛИ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ МУСКУЛАТУРЫ ПЛАНАРИЙ, ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ И КОНФОКАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ

© 2017 г. Н.Д. Крещенко

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: nkreshch@rambler.ru

Поступила в редакцию 28.11.16 г.

С помощью гистохимического окрашивания актиновых филаментов флуоресцентно меченным фаллоидином изучены детали морфологического строения мускулатуры тела у планарий *Girardia tigrina* и *Polycelis tenuis*. Тотальные препараты и замороженные срезы тканей планарий анализировали при помощи флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. Показано, что мышечная система у двух видов планарий хорошо дифференцирована и представлена соматической мускулатурой стенки тела, мускулатурой пищеварительного тракта и мускулатурой органов репродуктивной системы у *P. tenuis*, размножающихся половым способом. Было описано сходство и различие морфологических характеристик мускулатуры у изучаемых видов планарий относительно размеров и плотности расположения миофибрилл в различных мышечных слоях. Изучение строения мускулатуры у *P. tenuis* и *G. tigrina* может служить основой для дальнейшего изучения регуляции мышечной функции у планарий.

*Ключевые слова:* планарии, мускулатура, флуоресцентная микроскопия, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, фаллоидин.

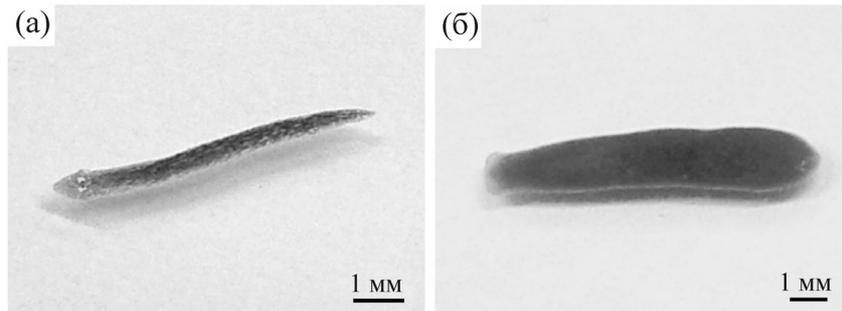
Свободноживущие плоские черви, планарии (класс Turbellaria, тип Platyhelminthes), используются в качестве биологического объекта при изучении эволюционных аспектов формирования нервной системы [1,2], исследования процессов регенерации [3,4], бесполого размножения [5,6], пролиферации стволовых клеток [7,8], а также влияния физических [9–11] и химических факторов [12,13] на морфогенетические процессы.

Мускулатура планарий принимает участие в различных видах двигательной активности – локомоции, поглощения пищи, процессах полового и бесполого размножения. Мускулатура выполняет структурную функцию и, в отсутствие настоящей скелетной системы у этих организмов, поддерживает и сохраняет форму их тела. Планарии используют мускулатуру для поиска добычи, ее захвата и удержания, а также поглощения пищи с помощью мускулистой глотки, способной выдвигаться наружу. Сокращение мускулатуры в хвостовой области тела планарий способствует, по всей вероятности, успешному отделению хвостового зооида в процессе их бесполого размножения. Мускулатура

у видов, размножающихся половым путем, служит для поиска партнера и осуществления репродуктивного поведения.

Мускулатуру у планарий изучали на ультраструктурном [14,15] и микроскопическом уровне с использованием срезов тканей [16–18]. Такие исследования включают трудоемкий процесс получения серийных срезов, требующий дальнейшего тщательного микроскопического анализа и последующей их реконструкции и интерпретации. Разработка гистохимической методики идентификации актиновых филаментов с помощью токсина из бледной поганки *Amanita phalloides* – фаллоидина, способного необратимо связываться с фибриллярным актином мышечной клетки, – привела к существенному прогрессу в исследовании цитоскелета мышечного волокна [19,20]. Конъюгация фаллоидина с флуорохромом (например, TRITC или FITC) позволила исследовать окрашенные таким способом ткани с помощью флуоресцентного микроскопа. Наличие актина было продемонстрировано итальянскими исследователями в 1992 г. [21] и явилось базой для применения данного метода у планарий. Применение тотальных препаратов для анализа с помощью конфокальной лазерной сканирующей

Сокращение: PBS – фосфатный буфер.



**Рис. 1.** Фото планарий *Girardia tigrina* бесполой лабораторной расы (а) и природных планарий *Polycelis tenuis*, обитающих в водоемах бассейна р. Ока (б).

шей микроскопии позволило на современном уровне изучать морфологические особенности мускулатуры у представителей плоских червей. Актуальность работы обусловлена тем, что в ходе проводимых исследований можно получить важную информацию о строении мускулатуры тела для дальнейшего изучения механизмов мышечного сокращения, существующих на самых ранних этапах эволюционного развития животных.

Задачей настоящего исследования стало изучение морфологического строения мускулатуры тела у двух видов пресноводных свободноживущих планарий *Girardia tigrina* (Turbellaria, Dugesiidae) и *Polycelis tenuis* (Turbellaria, Planariidae) с использованием тотальных препаратов, замороженных срезов, флуоресцентно меченного фаллоидина и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культура планарий.** Планарий *G. tigrina* бесполой лабораторной расы (рис. 1а) содержали в больших стеклянных затемненных аквариумах с водопроводной и дистиллированной водой в соотношении 2 : 1 при температуре  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Природных планарий *P. tenuis*, размножающихся половым способом (рис. 1б), отлавливали в озерах бассейна р. Ока в окрестностях г. Пушкино (Московская обл.) и содержали в аквариумах в течение двух–трех месяцев. Животных кормили один–два раза в неделю мотылем или дождевым червем.

Для гистохимического окрашивания готовили замороженные срезы (*P. tenuis*) и тотальные препараты (*G. tigrina*) планарий. Окраска флуоресцентно меченым фаллоидином позволяла визуализировать миофиламенты мускулатуры тела, глотки, кишечника и репродуктивных органов животных.

**Гистохимия.** Планарий *P. tenuis* длиной 9–10 мм фиксировали 4%-м параформальдегидом (MP Biomedicals, США) в 0,1 М фосфатном буфере (PBS, pH 7,4; Helicon, Россия) в течение 4 ч при комнатной температуре, после чего образцы переносили в свежий раствор параформальдегида в пластиковые пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл на 6 ч при  $4^\circ\text{C}$ . Затем препараты помещали в 10%-й раствор сахарозы (Helicon, Россия) на PBS на 3–5 сут при  $4^\circ\text{C}$ , заливали в Tissue Tek compound (Tissue Tek, США) и готовили продольные срезы толщиной 12–17 мкм с помощью криотома Shandon Cryomatrix (Termoelectron Corporation, США) при температуре  $-18$ – $20^\circ\text{C}$ . Срезы собирали на обработанные поли-L-лизинном предметные стекла (Polysine, Menzel-Glaser, Германия), высушивали на воздухе в течение 1 ч и хранили при  $-20^\circ\text{C}$  до окрашивания. Перед окрашиванием срезы размораживали при комнатной температуре в течение 10–15 мин, промывали три раза по 5 мин в растворе PBST (PBS с добавлением 0,3% тритона X-100 (Sigma, США), 0,1% азида натрия (Helicon, Россия) и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (Amresco, США)). Срезы окрашивали во влажной камере в строго горизонтальном положении с помощью TRITC-меченого фаллоидина (Sigma, США; разведение 1 : 200), в течение 4–6 ч при  $4^\circ\text{C}$ . После промывки три раза по 5 мин в PBS срезы заключали в 90%-й глицерин (Helicon, Россия) на PBS, накрывали покровным стеклом и анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа.

Для приготовления тотальных препаратов планарий *G. tigrina* длиной 8–9 мм фиксировали 4%-м параформальдегидом в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4) под покровным стеклом в течение 4 ч при комнатной температуре. Образцы выдерживали далее в буфере PBST в течение 24 ч при  $4^\circ\text{C}$ , промывали несколько раз с помощью PBS и помещали на 12 ч в раствор TRITC- или FITC-меченого фаллоидина при  $4^\circ\text{C}$ . Готовые тотальные препараты размещали

на предметном стекле под каплей 75%-го глицерина на PBS и накрывали покровным стеклом.

**Микроскопия.** Готовые окрашенные срезы изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM600 (Leica, Германия), оснащенного цифровой фотокамерой DC300F (Leica, Германия). Для анализа использовали проходящий свет, флуоресцентный фильтр I3 со спектром возбуждения 450–490 нм и спектром эмиссии (флуоресценции) 515 нм для флуорохрома FITC (fluorescein isothiocyanate), а также фильтр N2.1 возбуждающего света с длиной волны 515–560 нм и спектром флуоресценции 590 нм, для локализации флуорохрома TRITC (tetramethylrhodamin isothiocyanate). Микрофотографии, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа, сохраняли в виде файлов в формате TIFF высокого разрешения.

Тотальные препараты планарий анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SP5 (Leica, Германия) Центра коллективного пользования ИБК РАН (Пушино, Россия). Микрографии с конфокального лазерного сканирующего микроскопа представлены в виде суммарной проекции от 8–16 до 32 последовательных оптических срезов, полученных при сканировании через толщину препарата от 20 до 80 мкм и суммированных (при необходимости получить суммарное изображение) с максимальной интенсивностью флуоресценции при помощи программы анализа изображений, прилагаемой к конфокальному микроскопу. Для анализа использовали по крайней мере по пять–семь препаратов каждого вида. Измерения морфологических параметров проводили на изображениях, полученных с помощью флуоресцентного и конфокального сканирующего микроскопов, с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health, США), написанной на языке Java.

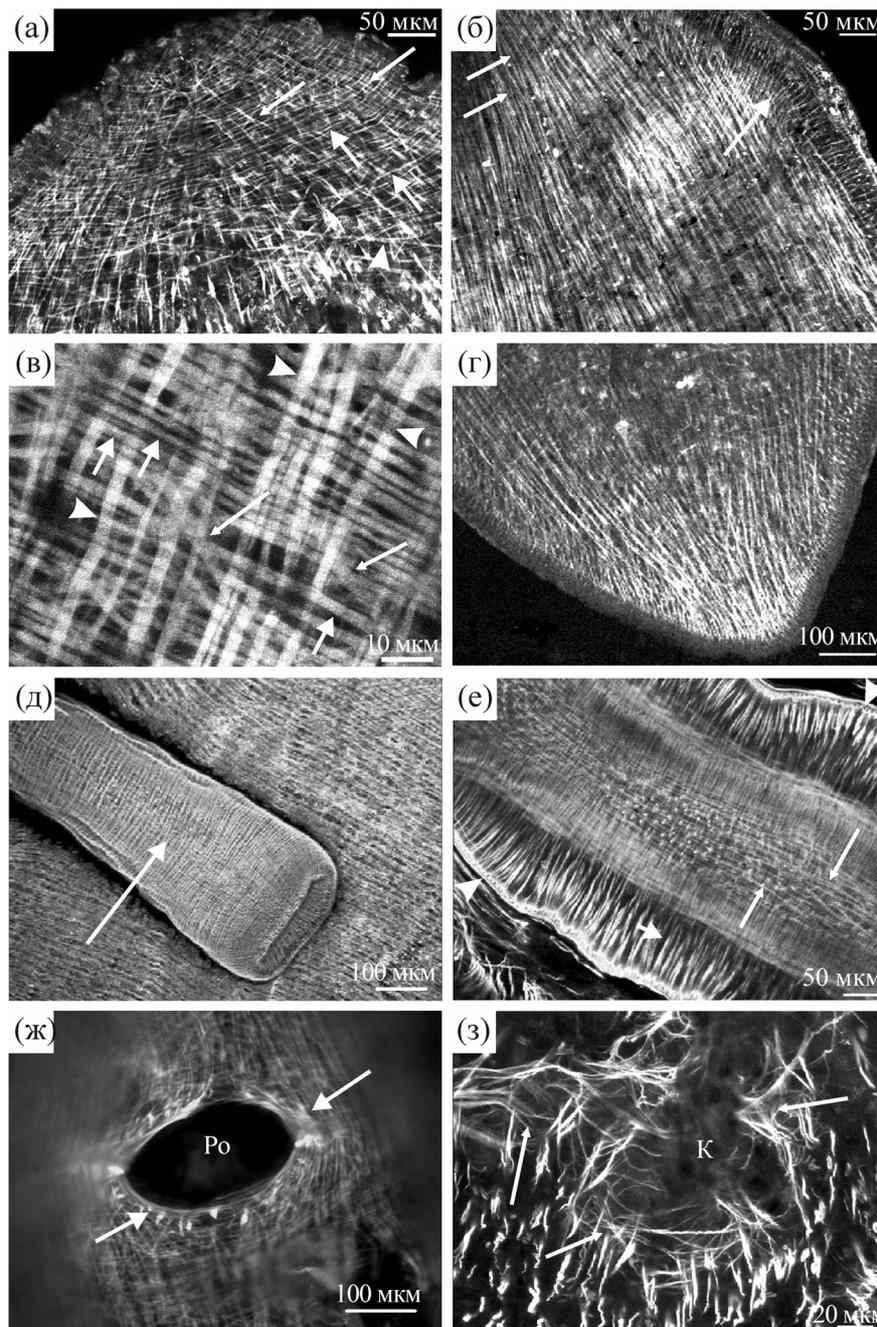
## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Организация мускулатуры тела у планарий *Girardia tigrina*.** Окраска фаллоидином выявила в теле планарий *G. tigrina* хорошо развитую мышечную систему, состоящую из многочисленных плотно упакованных миофиламентов. Мускулатура стенки тела подразделяется на три мышечных слоя – наружный слой регулярно расположенных кольцевых волокон, внутренний слой более толстых продольных мышечных волокон и слой немногочисленных диагональных волокон, расположенных между продольным и круговым мышечными слоями стенки

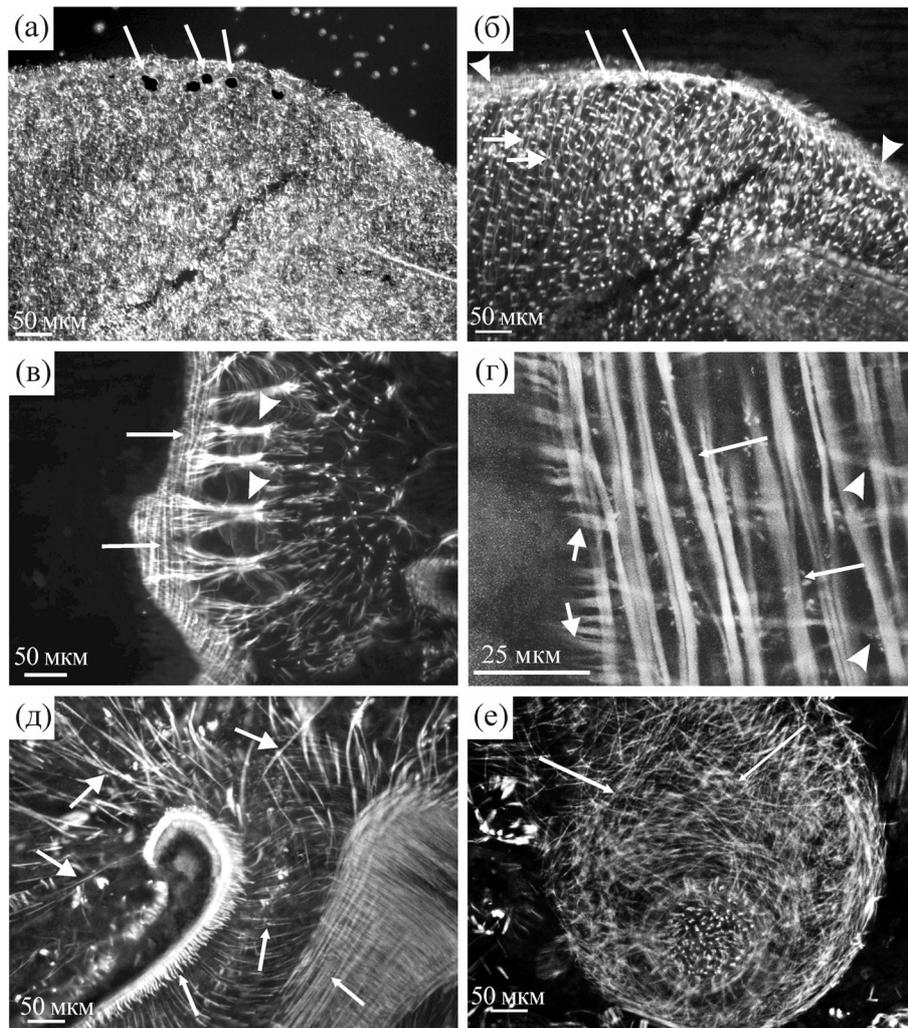
тела (рис. 2а,б). Такое строение характерно для различных участков туловища – от головного до хвостового отделов тела планарий (рис. 2б,г). Тонкие (1,8–2,4 мкм) и толстые (3,1–4,3 мкм) пучки круговых волокон наблюдали сразу под наружным эпителиальным слоем клеток, расстояние между ними составляет около 2,5–3 мкм, иногда до 5 мкм (рис. 2а,в). Диагональные мышечные филаменты стенки тела (толщиной 0,8–1,6 мкм) располагаются в двух пересекающихся направлениях (рис. 2а,в). Эти волокна неплотно упакованы с расстоянием между волокнами от 7 мкм до 14 мкм (рис. 2в). Внутренний продольный слой состоит из толстых (от 5 до 12 мкм) пучков плотно упакованных мышечных волокон с расстоянием между ними от 2,5–3 мкм, редко до 8 мкм (рис. 2б,в). Дорзо-вентральные мышечные волокна соединяют спинную и брюшную стороны стенки тела. Они располагаются более или менее равномерно и пронизывают все тело животного. Выявлены также тонкие поперечные мышечные волокна, простирающиеся от одной до другой боковой стороны туловища.

Мускулатура глотки, расположенной в центральной части туловища, имеет форму трубки (рис. 2д). Наружный мышечный слой глотки состоит из блоков продольных мышечных волокон, под ним находятся кольцевые мышечные волокна (рис. 2д). Внутренний мышечный слой глотки содержит кольцевые, продольные (рис. 2е) и диагональные волокна. Окраску фаллоидином наблюдали в коротких радиальных волокнах глотки, соединяющих наружный и внутренний мышечные слои глоточной стенки (рис. 2е). Мышцы, называемые якорными, расположенные в основании глотки и прикрепляющие глотку к телу планарии, интенсивно окрашены меченым фаллоидином. Мускулатура ротового отверстия, расположенного на брюшной стороне тела, содержит как кольцевые, так и радиальные мышечные волокна, образуя сфинктер, через который мускулистая глотка выдвигается наружу для нагнетания пищи в полость кишечника (рис. 2ж). Ветви разветвленного слепого кишечника у *G. tigrina* (рис. 2з) окружены очень тонкими, немногочисленными и нерегулярно ориентированными кольцевыми и диагональными мышечными волокнами.

**Мускулатура тела планарий *Polycelis tenuis*.** Окраска TRITC-меченым фаллоидином выявила у планарий *P. tenuis* развитую мускулатуру тела. Многочисленные маленькие «глазки» (фоторецепторы), расположенные на переднем конце тела, окружены очень тонкими мышечными филаментами (рис. 3а,б). У *P. tenuis* стенка тела, как и у *G. tigrina*, включает три слоя



**Рис. 2.** Мускулатура тела планарий *Girardia tigrina*, окраска TRITC-меченым фаллоидином (серым), конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. (а) – Головной конец тела планарий, продольные (острые длинные стрелки), кольцевые (тупые стрелки) и диагональные (острия стрелок) мышечные волокна стенки тела; (б) – головной конец, правая боковая сторона тела, плотный слой продольной мускулатуры (тонкие стрелки), более длинная и толстая стрелка указывает на мускулатуру в области аурикул (на фото правое из них) – чувствительных парных образований, расположенных на головном конце тела планарий; (в) – большее увеличение, верхний правый угол – к головному концу тела, отчетливо видны продольные (острия стрелок), кольцевые (тупые стрелки) и диагональные (тонкие длинные стрелки) волокна и пучки волокон разной толщины мускулатуры стенки тела; (г) – продольный слой мускулатуры хвостового отдела тела планарии; (д) – мускулистая глотка, расположенная в центральной области тела планарии, наружные продольный и кольцевой слой глоточной стенки; (е) – мускулатура глотки, оптический срез через центральную область глотки, видны продольные и кольцевые волокна внутреннего мышечного слоя глотки (длинные стрелки), а также радиальные (короткие стрелки) и кольцевые (острия стрелок) волокна наружного мышечного слоя глотки; (ж) – мускулатура сфинктера (стрелки) ротового отверстия (Po), расположенного на брюшной стороне тела планарии, через которое трубчатая глотка, благодаря работе якорных мышц, способна выдвигаться наружу для поглощения пищи; (з) – тонкие миофибриллы (стрелки), окружающие просвет слепого кишечника (К).



**Рис. 3.** Гистохимическая окраска мускулатуры тела TRITC-меченым фаллоидином (серым) на замороженных срезах тканей планарий *Polycelis tenuis*. (а) – Световая микроскопия, головной конец тела планарий с фоторецепторами (длинные стрелки). (б–е) – Флуоресцентная микроскопия: (б) – головной конец тела, круговые, диагональные (короткие тупые стрелки), продольные мышечные волокна (острия стрелок) мускулатуры стенки тела, на переднем крае – фоторецепторы, окруженные тонкими миофибриллами; (в) – продольные и диагональные мышечные волокна, формирующие мускулатуру стенки тела планарий (длинные стрелки) и плотные, регулярно расположенные дорзо-вентральные мышечные пучки (острия стрелок), соединяющие спинную и брюшную стороны тела; (г) – продольная (длинные стрелки) и кольцевая (короткие стрелки) мускулатура стенки тела с более тонкими диагональными миофибриллами (острия стрелок), расположенными между этими двумя слоями; (д) – базальный отдел глотки, мышечные волокна в составе мускулатуры глотки (тонкие стрелки) и якорных мышц (толстые стрелки), удерживающих глотку в теле планарий; (е) – тонкие неупорядоченные мышечные волокна в составе половой системы планарий (длинные стрелки).

мышечных волокон – кольцевые, продольные и диагональные (рис. 3б,г). Тонкий слой кольцевых мышечных волокон расположен сразу под эпителием и базальной мембраной (рис. 3в,г). Более толстые продольные мышечные волокна являются регулярно упакованными. Слой продольных мышечных волокон организован в пучки толщиной 3–5 мкм, состоящие из двух–четырех мышечных фибрилл с расстоянием между пучками около 4–5 мкм (рис. 3г). Кольцевой и диагональный слой мус-

кулатуры состоят, как правило, из единичных или сдвоенных мышечных волокон толщиной 1,3–2,1 мкм. Интенсивная окраска к фаллоидину присутствует в мышечных волокнах, соединяющих спинную и брюшную поверхности тела планарий *P. tenuis* (дорзо-вентральные волокна). Эти волокна имеют более или менее регулярное расположение (рис. 3б), некоторые из них пронизывают губчатую ткань головного нервного ганглия. Расположенные на расстоянии 50–60 мкм плотные (10–20 мкм) дорзо-вен-

тральные пучки, состоящие из нескольких мышечных волокон, были обнаружены в латеральной области тела планарий (рис. 3в).

Цилиндрическая мускулистая глотка прикреплена к телу ее базальным концом с помощью якорных мышц (рис. 3д). Глоточная трубка состоит из двух (наружного и внутреннего) мышечных слоев, содержащих кольцевые и продольные мышечные волокна, плотно упакованные в стенке глотки. Слои соединяются между собой с помощью радиальных волокон. Полость, в которой лежит глоточная трубка, расположена в середине тела. Ее стенки состоят из кольцевых, продольных и диагональных мышечных волокон и имеют такую же организацию, что и наружная мускулатура стенки тела (рис. 3д). Ветви слепого кишечника выстилаются неплотно расположенными очень тонкими мышечными филаментами. У *P. tenuis* удалось идентифицировать продольные мышечные волокна, подстилающие ветви слепого кишечника. Сложно устроенная репродуктивная система планарий *P. tenuis* включает в себя несколько органов, представляющих собой мускулистые трубки и резервуары. На рис. 3е видна копуляторная бурса, стенка которой содержит нерегулярно ориентированные, простирающиеся в разных направлениях тонкие (0,8–1,5 мкм) миофиламенты.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе гистохимический метод позволил охарактеризовать некоторые морфологические детали строения мускулатуры тела двух видов планарий. Впервые представлены количественные данные, позволяющие оценить размер мышечных волокон и расстояние между ними в разных слоях мускулатуры стенки тела планарий *G. tigrina* и *P. tenuis*. Наиболее важная информация получена в отношении *G. tigrina*, у которых удалось исследовать пространственную организацию мускулатуры на тотальных препаратах с помощью сканирующей микроскопии, в то время как у *P. tenuis*, вследствие их большего размера и толщины, приходилось использовать для анализа замороженные срезы.

При сравнении мускулатуры тела у *G. tigrina* и *P. tenuis* обнаружены общие черты строения. Микроскопический анализ показал, что мускулатура стенки тела у обоих видов высоко упорядочена и регулярно организована: под наружными кольцевыми мышечными волокнами расположены внутренние продольные волокна, вместе они составляют компактно упакованные слои мышц. Между ними находятся немногочисленные диагональные мышечные волокна.

У *G. tigrina* мускулатура несколько менее плотная, однако расположение слоев не отличается от такового у *P. tenuis*. Дорзо-вентральные мышечные волокна более или менее равномерно пронизывают все тело. Кишечник у *G. tigrina* окружен очень тонкими, немногочисленными и в целом неупорядоченными мышечными волокнами, среди которых наиболее заметны диагональные волокна, простирающиеся в двух перпендикулярных направлениях. У *P. tenuis* удалось выявить тонкие продольные мышечные волокна, подстилающие просвет кишечника, результаты были частично представлены ранее в тезисах докладов конференции по биологической подвижности [22]. Глотка у планарий *G. tigrina* и *P. tenuis* расположена в окологлоточной полости и прикреплена к телу своим базальным концом с помощью якорных мышц, описанных нами ранее у *Dugesia tigrina* при изучении регенерации глотки [23]. Наружный мышечный слой глотки у обоих исследованных видов состоит из блоков продольных мышечных волокон, под ним находятся кольцевые мышечные волокна. Внутренний мышечный слой глотки содержит кольцевые, продольные и диагональные волокна. Радиальные мышечные волокна соединяют наружный и внутренний мышечные слои.

Различия между двумя видами были выявлены в отношении размеров и плотности расположения миофибрилл, составляющих стенку тела. Кроме того, у планарий *P. tenuis* выявлена хорошо различимая мускулатура органов репродуктивной системы, которая полностью отсутствует у планарий *G. tigrina* вследствие их бесполого способа размножения.

Таким образом, в организме планарий присутствуют три мышечных системы. Первая – это соматическая мускулатура стенки тела, состоящая из наружных кольцевых, внутренних продольных и промежуточных диагональных мышечных волокон. К ней, по-видимому, нужно отнести также дорзо-вентральные волокна и латеральные мышечные пучки, обнаруженные у *P. tenuis*, составляющие каркас для внутренних органов, тканей и клеток тела. Вторая – это мускулатура пищеварительного тракта, состоящая из тонких, окаймляющих ветви слепого кишечника волокон, и плотной, хорошо развитой мускулатуры подвижной глотки. И, наконец, третья – мускулатура репродуктивного аппарата, идентифицированная у планарий *P. tenuis*.

Сведения о структурных свойствах мускулатуры планарий немногочисленны, получены с помощью различных методов и в основном касаются мускулатуры глотки. Известно, что

кроме актина [21] мышечные клетки планарий содержат миозин [18,24] и сочетают в себе свойства как гладких [14,15], так и поперечно-полосатых волокон. У планарий *Dugesia japonica* были обнаружены два гена – *DjMHC-A* и *DjMHC-B*, кодирующие два типа тяжелой цепи миозина [25], экспрессирующихся в разных мышцах тела – глоточных или туловищных. При изучении регенерации глотки у планарий *Dugesia tigrina* были использованы антитела TMUS13, наработанные против мышечных клеток планарий [16], которые специфически маркировали мускулатуру интактной и регенерирующей глотки. У планарий *D. japonica* для идентификации мускулатуры глотки в ходе ее регенерации были применены антитела к белку *DjMHC-A* [18]. У *D. tigrina* с помощью флуоресцентно меченного фаллоидина исследовали дифференцировку мышечных клеток глотки [23] и головного конца тела планарий [26] в процессе их регенерации. Иммуноцитохимическая локализация антител, наработанных к тяжелой цепи миозина *DjMHC-A* и *DjMHC-B*, позволила детально описать морфологическую структуру мускулатуры тела у планарий *D. japonica* [17].

В настоящее время благодаря окраске актиновых филаментов конъюгированным с флуорохромом фаллоидином и широкой доступности лазерной сканирующей микроскопии стало возможным на современном уровне изучать мускулатуру свободноживущих и паразитических представителей плоских червей [27,28]. Усилиями исследователей из Королевского университета Белфаста (Queen's University of Belfast, UK), Академического университета Або (Abo Academi University, Finland) и Центра паразитологии ИПЭЭ РАН им. А.Н. Северцова (Москва) была изучена мускулатура у ряда взрослых особей и личиночных форм паразитических червей: *Diphyllobothrium dendriticum* [29], *Fasciola hepatica* [30], *Schistosoma mansoni* [31,32], *Apatemon cobitidis proterorhini*, *Cotylurus erraticus*, *Vucephaloides gracilescens* [33], *Echinoparyphium aconiatum*, *Cyathocephalus truncatus* и других [34–36]. Сравнение полученных у планарий *G. tigrina* и *P. tenuis* данных с доступными сведениями об организации мускулатуры у других представителей плоских червей [37,38] показало, что они являются консервативными у представителей Platyhelminthes.

Таким образом, являясь ближайшими родственниками паразитических червей, с их сложными циклами развития, не поддающимися воспроизведению в лабораторных условиях, планарии, благодаря простоте разведения и удобству манипуляций с ними, могут использоваться в качестве биологической модели при поиске

новых лекарственных препаратов, эффективно и направленно воздействующих на мускулатуру плоских червей.

Автор выражает благодарность сотрудникам ИБК РАН В.А Яшину и А.В. Кучину за помощь в работе с программным обеспечением конфокального сканирующего микроскопа Центра коллективного пользования ИБК РАН.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-04-05948а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Reuter and M. K. S. Gustafsson, in *The nervous system of invertebrates: An evolutionary and comparative approach*, Ed. by O. Breidbach and W. Kutsch (Birkhuser Verlag, Basel, 1995), pp. 25–59.
2. O. I. Raikova, M. Reuter, U. Jondelius, and M. K. S. Gustafsson, *Tissue Cell* **32** (5), 358 (2000).
3. M. E. Isolani, M. Conte, P. Deri, and R. Batistoni, *Int. J. Dev. Biol.* **56**, 127 (2012).
4. A. Salvetti, L. Rossi, P. Iacopetti, et al., *Nanomedicine (Lond.)* **10** (12), 1911 (2015).
5. В. В. Исаева, *Онтогенез* **41** (5), 340 (2010).
6. В. В. Новиков и И. М. Шейман, *Биофизика* **57** (2), 346 (2012).
7. J. Vagunà, *Nature* **290**, 14 (1981).
8. D. Wenemoser and P. W. Reddien, *Develop. Biol.* **344**, 979 (2010).
9. Х. П. Тирас, Л. К. Сребницкая, Е. Н. Ильясова и др., *Биофизика* **41** (4), 826 (1996).
10. И. М. Шейман, В. В. Новиков и Н. Д. Крещенко, *Биофизика* **54** (6), 1114 (2009).
11. Н. А. Белова, А. М. Ермаков, А. В. Знобищева и др., *Биофизика* **55** (4), 704 (2010).
12. Н. Д. Крещенко и И. М. Шейман, *Онтогенез* **25** (6), 350 (1994).
13. А. М. Ермаков, О. Н. Ермакова, Х. П. Тирас и В. В. Леднев, *Онтогенез* **40** (6), 466 (2009).
14. E. K. MacRae, *J. Cell Biol.* **18** (3), 651 (1963).
15. M. Morita, *J. Ultrastruct. Res.* **13** (5–6), 385 (1965).
16. D. Bueno, J. Baguna, and R. Romero, *Histochem. Cell Biol.* **107** (2), 139 (1997).
17. H. Orii, H. Ito, and K. Watanabe, *Zool. Sci.* **19** (10), 1123 (2002).
18. T. Sakai, K. Kato, K. Watanabe, and H. Orii, *Int. J. Dev. Biol.* **46**, 329 (2002).
19. T. Wieland, *Naturwiss.* **64** (6), 303 (1977).
20. E. Wulf, A. Deboben, F. A. Bautz, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **9**, 4498 (1979).
21. R. Pascolini, F. Panara, I. Di Rosa, et al., *Cell Tissue Res.* **267**, 499 (1992).
22. N. D. Kreshchenko, in *Biological motility: Fundamental and Applied Science* (Pushchino, Foton-Vek, 2012), pp. 93–96.

23. N. Kreshchenko, M. Reuter, I. Sheiman, et al., *Invertebrate Reproduction and Development* **35** (2), 109 (1999).
24. F. Cebrià, M. Vispo, P. A. Newmark, et al., *Dev. Genes Evol.* **207**, 306 (1997).
25. C. Kobayashi, S. Kobayashi, H. Orii, et al., *Zool. Sci.* **15**, 851 (1998).
26. F. Cebrià and R. Romero, *Belg. J. Zool.* **131**, 5 (2001).
27. R. M. Rieger, W. Salvenmoser, A. Legniti, and S. Tyler, *Zoomorphology* **114**, 133 (1994).
28. D. W. Halton and A. G. Maule, *Can. J. Zool.* **82**, 316 (2004).
29. M. H. Wahlberg, *Cell Tissue Res.* **291**, 561 (1998).
30. G. R. Mair, A. G. Maule, Ch. Shaw, et al., *Parasitology* **117**, 75 (1998).
31. G. R. Mair, A. G. Maule, T. A. Day, and D. W. Halton, *Parasitology* **121** (2), 163 (2000).
32. G. R. Mair, A. G. Maule, B. Fried, et al., *J. Parasitol.* **89** (3), 623 (2003).
33. M. T. Stewart, A. Mousley, B. Koubkova, et al., *Int. J. Parasitol.* **33**, 413 (2003).
34. N. B. Terenina, O. O. Tolstenkov, H.-P. Fagerholm, et al., *Tissue and Cell* **38**, 151 (2006).
35. N. B. Terenina, L. G. Poddubnaya, O. O. Tolstenkov, and M. K. S. Gustafsson, *Parasitol. Res.* **104**, 267 (2009).
36. O. O. Tolstenkov, L. N. Akimova, N. B. Terenina, and M. K. S. Gustafsson, *Parasitol. Res.* **111** (5), 1977 (2012).
37. S. Tyler and M. Hooge, *Can. J. Zool.* **82**, 194 (2004).
38. Н. Б. Теренина и М. К. С. Густафссон, *Функциональная морфология нервной системы паразитических плоских червей (трематоды, цестоды)* (Москва, КМК, 2014).

## Some Details of the Morphological Structure of Planarian Musculature Identified by Fluorescent and Confocal Laser Scanning Microscopy

N.D. Kreshchenko

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

The details of the morphological organization of the body musculature in planarians *Girardia tigrina* and *Polycelis tenuis* have been investigated using histochemical staining of the actin filaments with fluorescently labeled phalloidin. The wholemount preparations and frozen tissue sections of planarian were analyzed by fluorescence and confocal laser scanning microscopy. Results indicates that the muscular system is well differentiated in both planarian species and represented by somatic musculature of the body wall, musculature of digestive tract and musculature of organs of reproductive system in *P. tenuis*, reproduced by a sexual mode. The similarities and differences in the morphological characteristics of the musculature in the planarian species studied were described with the special references to the size and density of myofibrils situated in different muscular layers. Observations on the musculature structure of *P. tenuis* and *G. tigrina* could serve as a basis for the further investigation of the muscle function regulation in planarians.

*Key words:* planarians, musculature, fluorescent microscopy, confocal laser scanning microscopy, phalloidin