

«Национальный исследовательский университет  
«Высшая школа экономики»

Лицей

Индивидуальная выпускная работа

**Изучение длительности памяти белых планарий после их  
обучения**

*Выполнила Адриан Александра Рэмовна*

Москва 2024

## Оглавление

Оглавление.....	2
Введение.....	3
Литературный обзор .....	4
Материал исследования.....	7
Метод исследования .....	9
Ход работы.....	10
Результаты.....	12
Заключение .....	14
Приложение .....	16
Список литературы .....	19

## Введение

Отличительной особенностью планарий от других представителей типа Плоские черви является наличие светочувствительных органов на головной части спинной стороны червя, то есть органов зрения (примитивных глаз), которые способны различать уровни освещенности.

Для приспособления к жизни в водной среде у этих животных также присутствуют хеморецепторы и сенсорные клетки, чувствительные к вибрациям, электрическим и магнитным полям. Информацию, собранную органами чувств, должна организовать и проанализировать нервная система червя, чтобы преобразовать ее в богатый и сложный набор поведенческих моделей, когда он ориентируются в окружающей среде.

Многие особенности нейронов планарий и синаптическая организация напоминают мозг позвоночных, а несколько нейромедиаторных веществ, идентифицированных в мозге человека, также присутствуют в нервной системе планарии<sup>1</sup>.

Все это ведет к мысли о том, что “мозг” белой планарии может быть достаточно развит, чтобы иметь память, подразумевая под этим умение зафиксировать и воспроизвести опыт, полученный в результате периодического повторения определенного действия.

Целью данного исследования является изучение длительности памяти молочно-белых планарий посредством их обучения и проверки скорости забывания изученного материала.

Задачами работы являются следующие пункты:

1. Отобрать для эксперимента 32 белые планарии.
2. Разделить червей поровну на 2 группы: обучающуюся и контрольную

---

<sup>1</sup> Информация из источника: Harvey B. Sarnat and Martin G. Netsky, 2015: The Brain of the Planarian as the Ancestor of the Human Brain

(группу, которая не будет проходить обучение).

3. Всех планарий по отдельности посадить в затемненные чашки Петри, обучающихся — в специально подготовленные с текстурным дном.
4. В период обучения в течение 10 дней кормить червей каждые 3 дня в темноте в чашках Петри, чтобы планарии привыкли к новой среде.
5. После окончания обучения пересадить планарий в отдельную темную емкость.
6. Спустя 1, 7, 14, 21 день провести тестирование червей (в каждом teste задействовать равное количество планарий из контрольной и обучающейся группы) и засечь время его прохождения.
7. Составить таблицу времени прохождения тестирования в зависимости от времени, прошедшего с окончания обучения.
8. Определить по результатам исследования, есть ли зависимость длительности памяти белых планарий от времени.

## Литературный обзор

Попытки выработать рефлексы у планарий начались еще в прошлом столетии. Ученый Джеймс МакКоннелл из Мичиганского университета начал ставить свои эксперименты над плоскими червями еще в конце 1950-х. Тогда он и его коллеги не могли представить, что беспозвоночных можно тренировать почти так же, как лабораторных крыс и мышей.

В своем методе обучения МакКоннелл использовал электрический ток. Ученый бил плоских червей разрядом каждый раз, когда они заплывали в освещенную часть аквариума. Таким образом, у планарий вырабатывался рефлекс избегания света. Однако ученый пошел дальше в своем исследовании.

Белые планарии, как и другие Плоские черви, обладают удивительными способностями к регенерации. Эксперименты показали, что даже 1/279 часть

червя<sup>2</sup> может восстановиться в полноценный организм.

В своем новом исследовании Джеймс МакКоннелл вновь обучил планарию, а после отделил хвостовую часть тела. После того, как “новая” планария регенерировала передний отдел, он поместил червя в чашку Петри и вновь начал обучение. В результате ученый смог зафиксировать, что белая планария с восстановленными нервными узлами обучалась быстрее, чем планария, первый раз участвовавшая в эксперименте.

Сделав такое открытие, МакКоннелл продолжил экспериментировать, пытаясь понять, как выработанный рефлекс мог передаться после регенерации. Он размельчил обученного червя в порошок и скормил необученным планариям. Такие особи также обучались быстрее.

Одной группе необученных планарий ученый дал порошок, обработанный раствором рибонуклеазы, фермента, разрушающего молекулы РНК. У этой группы обучение занимало больше времени, чем у предыдущих. Из этого МакКоннелл сделал вывод о способности РНК хранить память об определенных событиях.

Однако последние эксперименты ученого повторить удавалось в редких случаях, что говорит о недостоверности результатов и невоиспроизводимости условий. Работа подверглась критике. Выдвигались теории, что черви могли просто идти по следу уже обученных особей, которые специально избегали освещенных областей емкости. Также результаты, схожие с результатами МакКоннелла, достигались, сравнивая голодных и хорошо накормленных мясом необученных планарий.

Отступая от темы, стоит заметить, что позже Н.А. Тушмалова смогла дополнить результаты МакКоннела. РНКаза сама по себе замедляла выработку рефлексов у организма, не зависимо от их физиологических механизмов памяти.

---

<sup>2</sup> Информация из источника: Zhang S. 2013: Decapitation, But Not Cannibalism, Might Transmit Memories

Память ухудшалась и у планарий, и у инфузорий, и у крыс. Вывод данного исследования заключается в том, что необходимость участия РНК в процессах фиксации и воспроизведения опыта может быть объяснена участием этой кислоты в общерегулярных клеточных процессах.

В 2013 году ученые Тал Шомрат и Майкл Левин сделали прорыв в обучении белых планарий. В своем исследовании ученые постарались избежать погрешностей, которые допустили их предшественники. Для этого они использовали полностью автоматизированный тренажер (Automated training Apparatus —ATA), исключающий из эксперимента человеческий фактор. Так же это позволило протестировать больше червей одновременно в одинаковых условиях.

Камера ATA состояла из чашки Петри с шероховатым дном, окруженной стенками электрода. Устройство содержало четыре блока по три изолированные камеры, каждая из которых содержала по одному червию в чашке Петри, что позволяло одновременно отслеживать и обучать 12 отдельных червей (см. Рис.1, Приложение)»<sup>3</sup>.

Все данные о перемещении планарий обрабатывались с помощью камеры в каждой ячейке, что позволяло проводить объективный анализ поведения каждого животного во время испытаний. В устройстве также были предусмотрены средства для изменения освещения или удара электрическим током в ответ на определенные положения червя. Такое отрицательное подкрепление в этих экспериментах не использовалось, но способность обеспечивать обратную связь с каждым отдельным животным в режиме реального времени позволит использовать более сложные парадигмы обучения и тестирования.

Этап обучения каждого червя длился 10 дней. Червей разделили на две группы. Первая, обучающаяся, была помещена в затемненные чашки Петри с

---

<sup>3</sup> Цитирование: Shomrat T., Levin M. An automated training paradigm reveals long-term memory in planarians and its persistence through head regeneration, 2013

шероховатым дном. Вторая, контрольная, — в емкости с гладким дном, тоже находящиеся в темноте. Здесь червей кормили каждые 3 дня субстратом печени.

После периода обучения, группы по отдельности пересадили в другие емкости на 12 дней, где не было света, а планарий практически не кормили. После начался этап тестирования.

Обученных и необученных планарий раздельно помещали в шероховатую чашку Петри, в центре которой находилась капля питательного субстрата, освещенная ярким светом. У червей было 60 минут, чтобы достигнуть освещенной части и находиться там 3 минуты подряд. После этого тест считался пройденным.

Предполагалось, что обученные планарии быстрее приспособятся к новому условию окружающей среды (свету), поскольку шероховатость дна уже смогла выработать у них воспоминание, что червю ничего не угрожает.

Выводы подтвердили гипотезу. Обученные черви проходили тестирование гораздо быстрее, чем контрольная группа. На привыкание им требовалось до 8 минут, у червей в знакомой среде значительно сократились фазы исследования перед началом кормления.

Таким образом, ученые предположили, что у планарий есть долговременная память, которая смогла сохраниться у них даже через 2 недели после обучения.

## Материал исследования

Материалом исследования была выбрана группа особей молочно-белых планарий (*Dendrocoelum lacteum*). Это представитель типа Плоские черви, класса Ресничные черви. Является трехслойным свободноживущим организмом с билатеральной симметрией тела. Белые планарии — пресноводные черви,

обитающие в водоемах Европы под подводными камнями и опавшими листьями у берегов.

Наибольшее значение для данного исследования представляет строение нервной системы планарий. Она состоит из субэпидермального (находящегося под покровами тела) мозга, нескольких нервных тяжей (коннектив), отходящих от нервного узла к заднему концу тела, и перемычек между тяжами (комиссур).

Головной узел белых планарий, в отличие от многих представителей турбеллярий (Ресничных червей) имеет форму концентрированного двусторонне симметричного мозга вместо кольцевого ганглия. Такая форма делает планарий более продвинутыми, позволяя им осуществлять сложные поведенческие реакции по сравнению с другими представителями класса.

2 продольных нервных тяжа соединяются с комиссурами, расположенными на равном расстоянии друг от друга. Последние в свою очередь связаны с нервной сетью, залегающей под мышечными слоями стенки тела. Эта внутренняя нервная сеть в свою очередь связана с двумя другими, занимающими периферическое положение сетями, одна из которых залегает между эпидермисом и мускулатурой, а вторая непосредственно в эпидермисе<sup>4</sup>. И хотя нервные элементы уже отчасти сконцентрированы в мозге и продольных тяжах, в целом нервная система еще сохраняет диффузный характер, хотя и классифицируется как лестничная система столбчатого типа.

«Такой уровень организации нервной системы предполагает существование определенного иерархического соподчинения, когда одни ее отделы контролируют функционирование других, что недостижимо в простых нервных сетях. У всех турбеллярий нервная система относительно примитивна, поскольку в ней отсутствуют ганглии (за исключением мозга). Однако в ней присутствуют типичные сенсорные, двигательные и вставочные нейроны»<sup>4</sup>.

---

<sup>4</sup> Цитирование: Руперт Э.Э., Фокс Р.С., Барнс Р.Д. 2008: Зоология беспозвоночных Том 1, С. 407-417

Органы чувств белых планарий представлены парой глазков на головном отделе тела, многочисленными непарными статоцистами, расположеными медиально около мозга и отвечающими за чувство равновесия, хеморецепторами и одноклеточными ресничными рецепторами, которые по сути своей являются механорецепторами.

Глазки организованы по бокаловидному типу и состоят из фоторецепторных и пигментных клеток глазной чашечки. Основная функция глазков — определение направления источника света. Стоит отметить, что планарии, как и большинство турбулярий, имеет отрицательный фототаксис, то есть движение от освещенного участка. При направлении на червя яркого луча света в природе он с большой вероятностью опустится на дно в поисках укрытия и замедлит движение. На такой реакции планарий во многом и основан поставленный эксперимент.

### Метод исследования

В качестве исследуемого рефлекса, на основе которого будет проверяться, насколько организация нервной системы белой планарии пригодна для образования долговременной памяти, была выбрана сенсорная реакция планарии на текстуру дна чашки Петри, в которой содержится червь.

Текстура поверхности придавалась с помощью остроконечного скальпеля, шириной стали лезвия 0,4 мм. Надрезы проводились каждые 2 мм параллельно друг другу. Аналогично были проделаны перпендикулярные надрезы (см. Приложение 2).

В полной темноте при комнатной температуре планарий нужно поместить в модифицированные емкости, не беспокоя и подкармливая червей. Такие действия должны закрепить у червей статус убежища, безопасного места, за текстурной чашкой Петри.

Для проверки работы приобретенного рефлекса обученных планарий требуется поместить в другую текстурную чашку Петри с одним нововведением — центр емкости должен быть освещен лучом яркого белого света, создавая круг диаметром 1,5 см. В качестве источника света используется диод яркостью 400 люмен, расположенный на высоте 13 см от поверхности чаши (см. Приложение 3). Планарий требуется поместить в затемненную часть чаши Петри, специально накрытую светонепроницаемым покрытием, чтобы избежать попадания рассеянных лучей, а в освещенной части расположить питательный субстрат.

Измеряемый параметр — время, за которое червь полностью переместился в центр емкости. У каждой планарии есть 60 минут, за которые она должна успеть пробыть на свету 3 минуты подряд. Такой тест должен показать, насколько быстро планария привыкла к новому условию среды — свету. Предполагается, что нервная система этих червей способна выработать рефлекс “расслабления” на ощущение текстурного дна под собой, способствуя скорой адаптации.

## Ход работы

Для эксперимента было отобрано 32 молочно-белые планарии (*Dendrocoelum lacteum*), изученные на отсутствие видимых физических увечий и дефектов. Черви были разделены на 2 группы по 16 особей в каждой.

Первая группа червей была помещена по отдельности в чаши Петри с текстурированным дном (см. раздел Метод исследования). Вторая группа планарий участвовала в контролльном эксперименте, поэтому также раздельно была помещена в обычные чаши Петри с гладким дном.

Все емкости, заполненные отфильтрованной аквариумной водой, где содержались планарии по обучения, были помещены в термостат модели ТВ-20-ПЗ-К с выставленным температурным режимом на 20°C на 10 дней. Внутри

данного устройства отсутствуют какие-либо источники света, что крайне важно для эксперимента.

Термостат открывался каждые 2 дня для подкормки червей. В качестве пищи использовались микрохлопья для мальков рыб Tetra TetraMin Baby, содержащие рыбу, моллюсков и раков, зерновые культуры, водоросли и т.д. Во время открытия термостата свет в лаборатории выключался, чтобы не прерывать обучение червей.

После окончания срока обучения две группы раздельно друг от друга ссадили в 2 аквариума (все так же затемненные), где содержались до дня проверки. Подкормка проводилась каждый 4-й день.

Проверка работы рефлекса проводилась на 1-й, 7-й, 14-й, 21-й день после завершения обучения. В каждый из дней из 2 групп случайным образом отбиралось по 4 червя. Каждого по одному запускали в частично-освещенную чашку Петри с текстурным дном (см. раздел Метод исследования).

При проверке фиксировалось время полного перемещения планарии к питательному субстрату в центр чаши (секундомер останавливался, когда организм был полностью освещен), после чего червь оставался на свету в течение 3 минут. При таких условиях тест считался пройденным. Если червь пробыл 180 секунд в центре емкости уже после истечения указанного времени (1 часа), считалось, что это результат новой адаптации, а не работы выработанного рефлекса, то есть планария полностью забыла изученный материал.

## Результаты

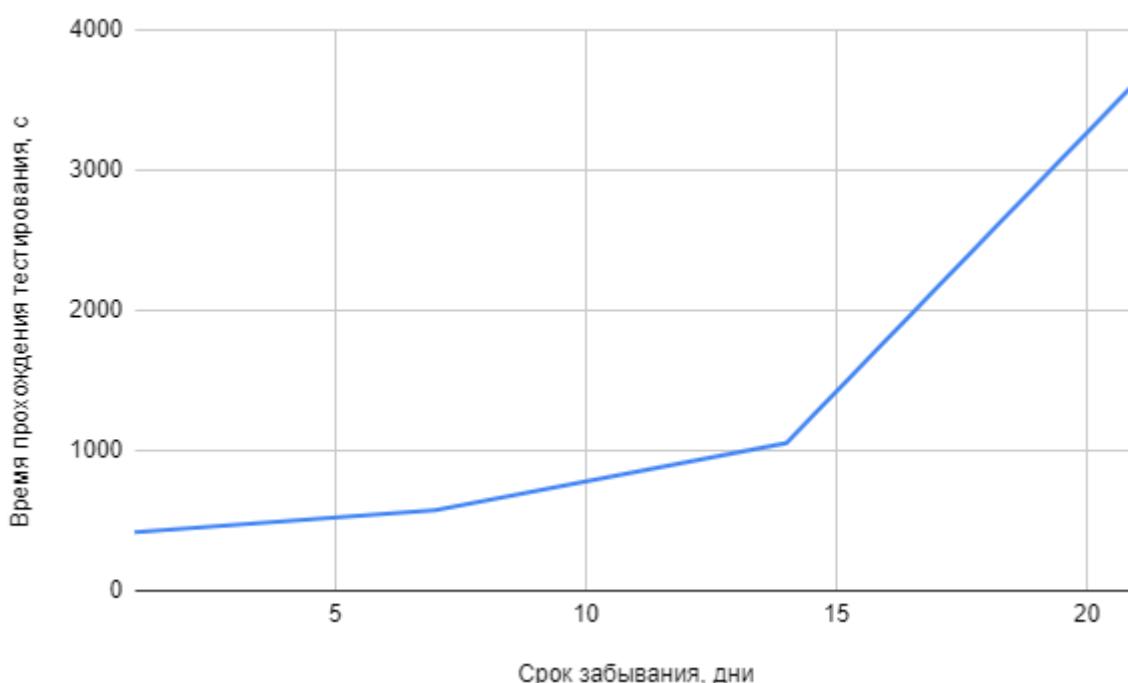
На основе полученных результатов была составлена сводная таблица:

Время, прошедшее после окончания обучения, дни	Время перемещения в освещенную часть, с	
	Обучающаяся группа	Контрольная группа
1	476	3982
	469	3788
	312	3776
	414	3954
7	541	3720
	3672	3991
	535	3606
	649	3882
14	1088	3703
	1006	3625
	1128	3844
	991	4017
21	3500	3951
	3612	3687
	3967	3775
	3469	3862

В первый день проверки все обученные планарии справились с тестом меньше, чем за 8 минут. Через неделю после окончания обучения с задачей справились только 3 червя, однако их время все еще было меньше 700 секунд (впоследствии результат планарии, не прошедшей тестирование, не учитывался как случайная погрешность). В третий день проверки большинству испытуемых понадобилось больше 14 минут, однако все черви оказались в освещенной области в установленный срок. Спустя 21 день после завершения обучения только половина особей смогла пройти тест, при этом их время достигало максимально допустимых значений (около 60 минут).

Результаты контрольного эксперимента показали, что ни один необученный червь не сумел пройти тестирование, при этом время перемещения к питательному субстрату находилось в одном диапазоне (за исключением случайных выбросов). Это подтверждает наличие у белых планарий способности к обучению.

Для определения зависимости между скоростью прохождения тестирования и сроком, прошедшим после окончания обучения, были взяты средние арифметические в каждом из дней обучения. На основе полученных данных был построен график зависимости времени прохождения тестирования от срока забывания изученного материала:



На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что зависимость между качеством памяти белых планарий и временем, прошедшим с завершения обучения, существует. Чем больше был срок забывания изученного материала, тем больше времени червю требовалось, чтобы его вспомнить. Это отражалось на времени, потраченном, чтобы приспособиться к новому условию окружающей среды, то есть чтобы пройти проверку.

Самый лучший результат показала первая проверка, однако и спустя неделю после обучения планарии успешно справлялись с тестированием. Это указывает на то, что такой промежуток времени значительно не влияет на успешную работу выработанного рефлекса

После 14 дней забывания качество воспоминаний заметно ухудшается. В общем и целом, с каждой новой проверкой время привыкания увеличивалось в прогрессии, исходя из чего можно предположить, что забывание происходило неравномерно (см. Приложение 4).

Стоит отметить, что в данном исследовании не был найден предел длительности памяти молочных планарий, было лишь выяснено, что он расположен после отметки в 21 день после окончания обучения (хотя половине испытуемых хватило и этого промежутка времени). В связи с тем, что забывание материала происходит быстрее с каждым днем, можно предположить, что искомый предел находится близко к дате последней проверки в данном эксперименте.

## Заключение

Данное исследование еще раз подтвердило способность планарий вырабатывать новые рефлексы. Это согласуется с тем, что все только что

обученные планарии успешно справились с тестированием.

В течение эксперимента был определен примерный промежуток времени полного забывания изученного материала. Он составляет около 21-23 дней, прошедших с окончания обучения. Важным открытием стало, что качество воспоминаний ухудшается не равномерно, а прогрессивно, наращивая темпы со временем.

Результаты, полученные в данном исследовании, можно применить для оптимального планирования экспериментов, связанных с тестированием планарий с выработанными рефлексами.

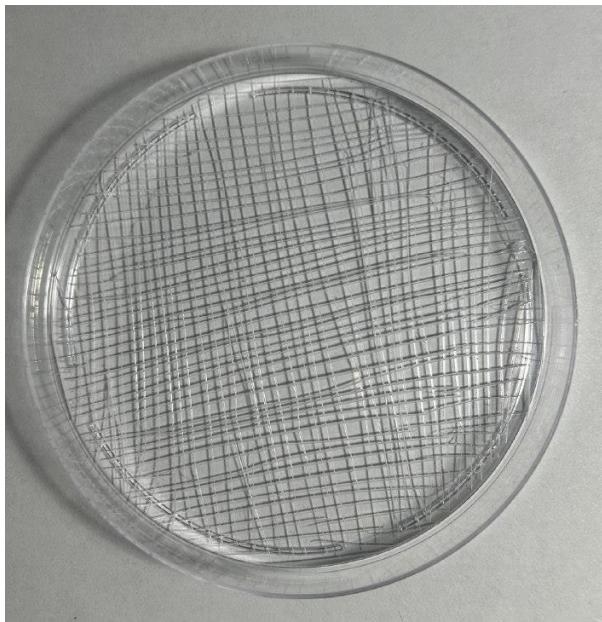
Уточнение сроков забывания изученного материала и выведение формулы зависимости качества памяти от времени могут стать задачей новых исследований в этой области.

## Приложение

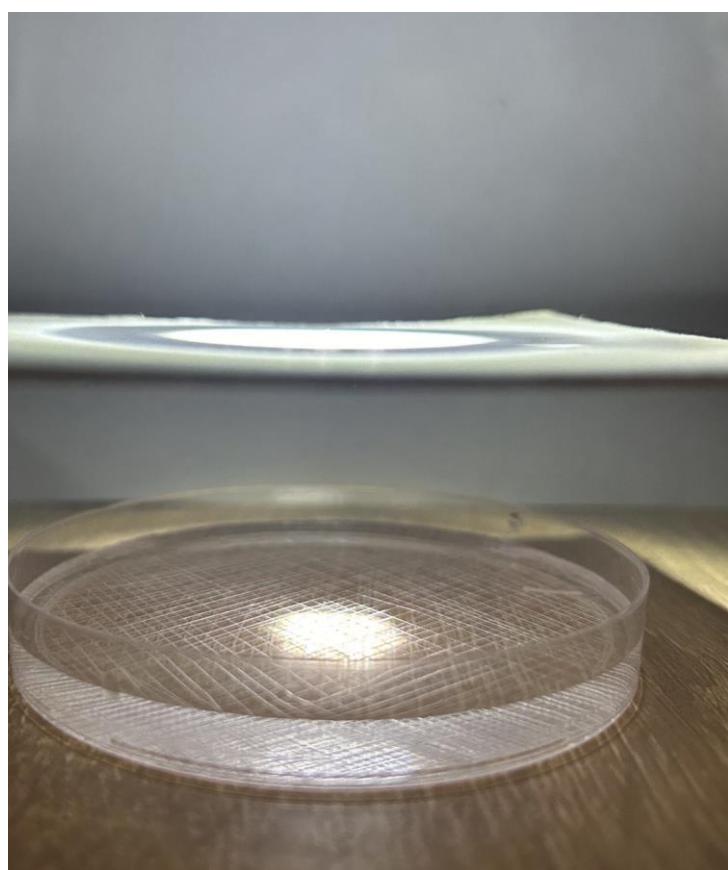
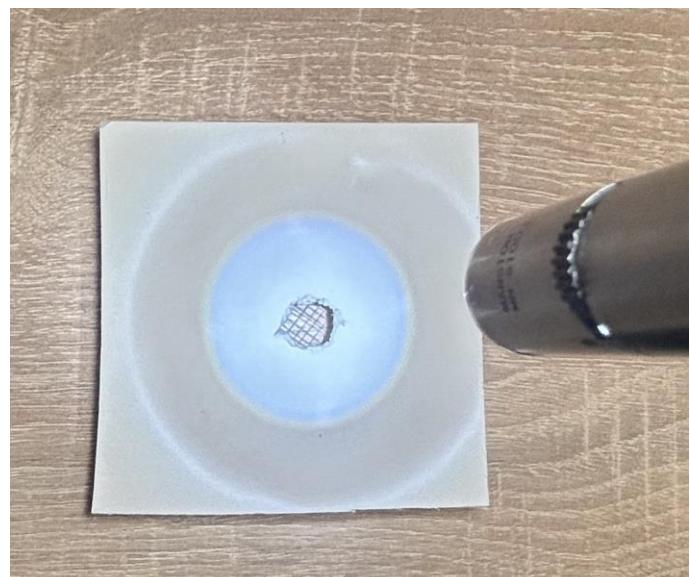
### 1. Устройство для автоматизированного обучения (АТА)



### 2. Текстурная чашка Петри



3. Установка для тестирования белых планарий (*все фотографии сделаны в присутствии стороннего источника света*)



#### 4. Опорная таблица для построения графика

Время прохождения тестирования, с	Срок забывания, дни	Разница с предыдущим периодом, с
417,75	1	-
575	7	157,25
1053,25	14	478,25
3637	21	2583,75

## Список литературы

1. *Харви Б. Сарнарт, Мартин Г. Нетски* Мозг Планарий как Предок Мозга Человека // The Brain of the Planarian as the Ancestor of the Human Brain, 2015
2. *МакКоннел Дж. В.* Каннибализм и Память Плоских Червей // Cannibalism and memory in flatworms, 1964
3. *Риллинг М.* Забытые Поиски Обучения Планарий 1960-х Джеймсса МакКоннела, Биохимическая Энграмма и Селебрити // Загадка Пропавших Цитат // James McConnell's Forgotten 1960s Quest for Planarian Learning, a BiochemicalEngram, and Celebrity // The Mystery of the Vanished Citations, 1996
4. *Цанг С.* Обезглавливание Может Передавать Воспоминания в Отличие от Каннибализма // Decapitation, But Not Cannibalism, Might Transmit Memories, 2013
5. *Тушмалова Н.А.* Современные Представления о Макромолекулярных Механизмах Памяти, 2009
6. *Шломрат Т., Левин М.* Парадигма Автоматизированного Обучения Выявляет Долговременную Память Планарий и ее Сохранение После Регенерации Головы // Журнал Экспериментальной Биологии // An Automated Training Paradigm Reveals Long-term Memory in Planarians and its Persistence Through Head Regeneration // Journal of Experementalbiology, 2013
7. *Руперт Э.Э., Фокс Р.С., Барнс Р.Д.* Зоология беспозвоночных Том 1 Протисты и низшие многоклеточные, С. 407-417 / Пер. с англ. под ред. А.А.Добровольского и А.И.Грановича М.: Академия, 2008