

БОБРОВСКАЯ
Надежда Владимировна

**МЕХАНИЗМЫ АУТОТОМИИ И РЕГЕНЕРАЦИИ
ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ У МОРСКОЙ ЛИЛИИ
*HIMEROMETRA ROBUSTIPINNA***

03.03.05 – биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2014

Работа выполнена в лаборатории сравнительной цитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, старший научный сотрудник **Долматов Игорь Юрьевич**

Официальные оппоненты:

Григорян Элеонора Норайровна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, заведующий лабораторией проблем регенерации

Костюченко Роман Петрович, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет», доцент, и.о. обязанности заведующего кафедрой эмбриологии биологического факультета

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита диссертации состоится «27» марта 2015 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу:

690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

Факс: (423)2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.wimb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/soviet-d-005-008-01/17-bobrovskaya-nadezhda-vladimirovna>

Автореферат разослан «_____» февраля 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Вашченко

Вашченко Марина
Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

В процессе своей жизнедеятельности организмы постоянно испытывают на себе разнообразные воздействия окружающей среды. Эти воздействия могут быть как положительные, так и отрицательные. Часто неблагоприятное влияние окружающей среды может приводить к нарушению целостности организма. В этой связи одной из важных адаптаций к повреждающим воздействиям, как биотическим, так и абиотическим, является регенерация. Практически все современные организмы хотя бы в минимальной степени способны к восстановлению повреждённых структур, что повышает выживаемость как отдельных особей, так и вида в целом (Воронцова, Лиознер, 1957; Короткова, 1997; Brockes, Kumar, 2008). Изучение регенерации у животных продолжается более 200 лет. За это время было изучено большое число видов, сделан ряд обобщений. Показано, в частности, что в филогенезе нет чётко выраженной закономерности изменения восстановительных способностей, но чем выше организация животного, тем труднее происходит регенерация больших частей тела и внешних придатков. Предполагают, что это связано с большей специализацией органов и тканей, с более глубокой дифференцировкой составляющих их клеток (Лиознер, 1982; Карлсон, 1986). Одной из важнейших задач современных исследований регенерации является выяснение клеточных и молекулярных механизмов восстановления органов и тканей.

Со способностью регенерировать утраченные структуры непосредственно связана другая широко распространённая в природе адаптация – аутономия. Аутономия, или самопроизвольное отделение части тела, у животных является важной особенностью, способствующей выживанию всей особи за счёт утраты части тела (Wilkie, 2001). Она свойственна как беспозвоночным, так и позвоночным животным. Адаптивность аутономии связана в первую очередь с тем, что отбрасывание придатка, захваченного хищником, даёт возможность особи избежать гибели. Кроме того, отделение повреждённой структуры в строго определённом месте минимизирует травмирующее воздействие на организм и увеличивает скорость регенерации (Maginnis, 2006; Fleming et al., 2007).

Несмотря на длительность изучения регенерации и аутономии, многие вопросы этих феноменов остаются далеки от своего решения. Это связано со сложностью данных явлений и относительно небольшим числом модельных объектов, на которых исследуются механизмы аутономии и регенерации. Иглокожие в плане исследования аутономии и регенерации представляют собой уникальную группу. Филогенетически они являются вторичноротыми животными и, вместе с полухордовыми, образуют группу Ambulacraria,

которая является сестринской для хордовых животных (Swalla, Smith, 2008). Кроме того, иглокожие – одна из немногих групп, у которой наличие аутономии и регенерации установлено ещё для палеозойских представителей (Oji, 2001; Baumiller, 2008). У современных иглокожих эти способности также хорошо выражены и достаточно разнообразны (Долматов, 1999; Candia Carnevali, 2006; Долматов, Машанов, 2007). Многие виды Echinodermata способны к различным типам аутономии (Human, 1955) и могут восстанавливать как внешние придатки, так и внутренние органы (Kille, 1939, 1942; Долматов, Машанов, 2007; Mashanov, Garcia-Araras, 2011). Кроме того, они способны регенерировать крупные отделы тела, например, лучи, а также восстанавливаться после разрезания на две части (Torelle, 1910; Emson, Wilkie, 1980; 2007; Dolmatov, 2014).

Наиболее древними из ныне существующих иглокожих являются морские лилии (Crinoidea). Эти животные способны аутомировать различные придатки тела, а затем их достаточно быстро регенерировать (Amemiya, Oji, 1992, Candia Carnevali, 2006). Кроме того, имеются виды, которые могут восстанавливать пищеварительную систему после её полной утраты (Dendy, 1886; Meyer, 1988; Mozzi et al., 2006). У некоторых криноидей все внутренние органы, расположенные в чашечке (висцеральная масса), легко удаляются; в природе часто встречаются особи с отсутствующей или регенерирующей висцеральной массой (Dendy, 1886; Meyer, 1985). До сих пор не ясно, теряются ли внутренние органы в результате отрыва их хищниками или же здесь имеет место настоящая аутономия. Кроме того, практически не изучены механизмы регенерации пищеварительной системы у представителей Crinoidea. На настоящий момент имеется только одна работа, посвящённая восстановлению кишки у морских лилий (Mozzi et al., 2006).

Давно показано, что у морской лилии *Himerometra robustipinna* висцеральная масса легко удаляется при механическом воздействии (Meyer, 1988). Кроме того, в природе часто встречаются особи с отсутствующими или регенерирующими внутренними органами (Meyer, 1988). Предполагается, что висцеральная масса у данного вида утрачивается в результате атак хищных рыб (Meyer, 1985). В то же время непонятно, какова реакция самой морской лилии на подобное воздействие и есть ли она вообще. Вилки (Wilkie, 2001) указывал, что лёгкое отделение висцеральной массы у криноидей говорит в пользу того, что этот процесс является аутономией.

Целью данной работы является изучение механизмов аутономии пищеварительной системы и её регенерации у морской лилии *Himerometra robustipinna*.

Задачи исследования включали: (1) изучение строения пищеварительной системы у *H. robustipinna* в норме; (2) изучение механизмов отделения пищеварительной системы у

H. robustipinna; (3) выявление клеточных механизмов регенерации пищеварительной системы *H. robustipinna* после её полного удаления.

Научная новизна. Получены новые данные по морфологии висцеральной массы у данного вида морской лилии, как в норме, так и в процессе регенерации на тканевом и клеточном уровне. Впервые для морских лилий подробно изучено место прикрепления висцеральной массы к чашечке. Впервые показано, что процесс отделения висцеральной массы у морской лилии *H. robustipinna* является истинной аутоотомией. Механизмы аутоотомии, вероятно, являются типичными для иглокожих. В них задействованы специфические клетки, юксталигаментные клетки, способные влиять на механические свойства соединительной ткани. Впервые показано, что у *H. robustipinna* юксталигаментные клетки являются бифункциональными: они принимают участие в процессе аутоотомии и являются основным клеточным источником регенерации кишки. В процессе восстановления эти клетки трансдифференцируются в энтероциты. Такая бифункциональность отражается в строении юксталигаментных клеток. В отличие от других изученных видов иглокожих, у *H. robustipinna* в этих клетках содержатся гранулы двух типов. Первый тип (электронно-плотные гранулы) является типичным для юксталигаментных клеток иглокожих. Они выбрасываются при аутоотомии во внеклеточный матрикс и, вероятно, участвуют в изменении механических свойств соединительной ткани. Второй тип гранул (гранулы с веществом средней электронной плотности) изменяются в процессе регенерации и, возможно, содержат факторы, регулирующие трансдифференцировку. Кроме того, впервые на ультраструктурном уровне описано полное восстановление пищеварительной системы морской лилии *H. robustipinna* и найден источник регенерации клеток пищеварительного эпителия, целомического эпителия, эпидермиса, эпителия амбулакральных желобков. Установлены сроки регенерации кишки.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные данные по ультраструктурной организации пищеварительной системы и висцеральной массы в целом у морской лилии *H. robustipinna* дополняют наши знания о строении животных класса Crinoidea. Нами было впервые показано, что процесс отделения висцеральной массы у данного вида морской лилии является истинной аутоотомией. Впервые был описан процесс регенерации пищеварительной системы после аутоотомии у *H. robustipinna* и установлены клеточные источники регенерации пищеварительного эпителия. Полученные данные позволяют лучше понять тонкие механизмы восстановительных морфогенезов у животных и расширяют наши представления о разнообразии и ультраструктурной организации

юксталигаментных клеток и их функций у иглокожих. На основании полученных результатов можно глубже понять сущность феномена регенерации не только у беспозвоночных, но и у позвоночных животных, что, очевидно, поможет в решении вопроса об увеличении восстановительных потенций органов у млекопитающих, в частности у человека.

Личный вклад автора заключается в участии в постановке экспериментов, сборе, фиксации и обработке материала, самостоятельном анализе полученных данных и подготовке публикаций.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены на ежегодных научных конференциях ИБМ ДВО РАН (Владивосток, 2012, 2013, 2014); на 14-ой Международной конференции по иглокожим (Брюссель, 2012); на Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов» (Борок, 2012); на Всероссийской конференции с международным участием «Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция» (Санкт-Петербург, 2013).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 работ, в том числе две статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 118 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Работа содержит 32 иллюстрации (схемы и электронограммы). Список литературы состоит из 220 наименований, из них 189 на иностранных языках.

Благодарности. Выражаю огромную благодарность всем сотрудникам Лаборатории сравнительной цитологии ИБМ ДВО РАН за приобретение навыков работы в области морфологии и регенерации иглокожих, помощь и поддержку, оказанную в ходе подготовки и проведения работы. Сердечно благодарю своего научного руководителя д.б.н. И.Ю. Долматова за помощь и ценные советы на всех этапах исследования. Отдельную благодарность выражаю к.б.н. Л.Т. Фроловой за помощь в освоении гистологических методов исследования и подготовке материала для световой и электронной микроскопии, а также инженеру Д.В. Фомину за обучение и помощь в работе на электронных микроскопах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 11-04-00408 и № 14-04-00239), ДВО РАН (грант № 12-И-П6-06) и Правительства РФ (грант № 11.G34.31.0010).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Для проведения исследований использовали взрослых особей морской лилии *Himerometra robustipinna* (Crinoidea, Comatulida). Сбор животных проводили с апреля по июнь 2011–2014 гг. в разных районах зал. Нячанг Южно-Китайского моря. Во время проведения экспериментов животных содержали в аквариуме с проточной аэрируемой водой, температура которой составляла 27–29°C. Для исследования нормального строения висцеральной массы использовали взрослых особей *H. robustipinna*. Животных отлавливали, удаляли руки и цирры и оставшуюся висцеральную массу с чашечкой сразу помещали в фиксатор. Для исследования клеточных механизмов аутомии проводили эвисцерацию следующим образом. Висцеральную массу захватывали пинцетом на оральной стороне чашечки и удерживали 20–30 секунд, после чего висцеральная масса свободно отделялась. Чашечку и отделившуюся висцеральную массу фиксировали по отдельности сразу после аутомии. Для исследования процессов регенерации пищеварительной системы фиксацию животных проводили через 6, 12 и 18 часов, а также через 1, 2, 3, 4, 5 и 7 суток после аутомии. Всего было зафиксировано по пять особей на каждый срок регенерации. Материал для световой микроскопии фиксировали в жидкости Буэна или в 4% растворе формальдегида в морской воде. В этих же фиксаторах животных хранили 1–2 месяца при 4°C до начала обработки. Материал, фиксированный жидкостью Буэна, отмывали в 96% этаноле, обезвоживали в смеси этанола и хлороформа (1:1) и хлороформе. Материал, фиксированный формалином, декальцинировали 14 суток в 5% растворе ЭДТА на 4% формалине, после чего промывали в воде в течение одного часа, обезвоживали в серии этанолов возрастающей концентрации и хлороформе. Весь материал заливали в парафин. Срезы 5–6 мкм толщиной окрашивали гематоксилином по Эрлиху (Роскин, Левинсон, 1957) с докрасиванием эозином.

Для трансмиссионной электронной микроскопии материал фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида, приготовленном на 0,05 М какодилатном буфере (pH 7,4), в течение 2–3 ч при температуре 4°C. Затем промывали в том же буфере и дополнительно фиксировали 1% раствором OsO₄ на какодилатном буфере в течение 1 ч. Материал декальцинировали в смеси 1% растворов аскорбиновой кислоты и 0,15M NaCl (Dietrich, Fontaine, 1975), обезвоживали в этаноле и ацетоне, после чего заключали в смесь аралдита М и эпона 812 (Fluka) по стандартной методике (Glauert, Lewis, 1998).

Полутонкие срезы толщиной 0,7 мкм окрашивали 1% метиленовым синим в 1% водном растворе буры. Ультратонкие срезы толщиной 60 нм контрастировали 1% уранилацетатом в 10% этаноле и цитратом свинца по Рейнольдсу.

Для сканирующей электронной микроскопии материал фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида, приготовленном на 0,05 М какодилатном буфере (pH 7,4). Затем его обезвоживали в возрастающих концентрациях этанола и в ацетоне и высушивали в CO₂. Высушенные образцы закрепляли на специальных столиках и напыляли хромом или золотом.

Результаты и обсуждение

1. Морфология морской лилии *Himerometra robustipinna*

Наше исследование показало, что морская лилия *H. robustipinna* имеет типичное для представителей отряда Comatulida строение (Догель, 1981; Heinzeller, Welsch 1994). Тело *H. robustipinna* состоит из чашечки и пяти дихотомически ветвящихся рук, несущих на себе пиннулы (Рис. 1А). Более крупные и обызвествленные проксимальные пиннулы прикрывают поверхность чашечки (Рис. 1Б). Чашечка представляет собой конусовидное образование. На более широкой, оральной стороне, имеются рот и анус (Рис. 1В). От рта, расположенного в центре чашечки, по радиусам расходятся пять амбулакральных желобков (Рис. 1В), которые переходят на руки, продолжают вдоль них и ответвляются в каждую пиннулу. В чашечке располагается комплекс внутренних органов (висцеральная масса), состоящий из кишки и осевого органа (Рис. 1Г). Висцеральная масса имеет пятилопастную форму за счёт того, что пищеварительная система своими выростами заходит на основания рук (Рис. 2А). Функция этих радиальных выростов, по-видимому, состоит в увеличении длины пищеварительного тракта, что должно способствовать более полному перевариванию пищи.

Оральная сторона висцеральной массы прикрыта специальной оболочкой, тегменом, который состоит из кутикулярного эпидермиса погруженного типа и подлежащего слоя соединительной ткани. Помимо эпителиоцитов, в эпидермисе встречаются два типа секреторных клеток.

Соединительная ткань тегмена состоит из пучков коллагеновых фибрилл и аморфного вещества. Ближе к основаниям рук во внеклеточном матриксе встречаются длинные отростки юксталигаментных клеток (ЮЛК, их описание дано ниже). Кроме того, в соединительной ткани тегмена отмечаются одиночные склероциты, а также нервные клетки и их отростки.

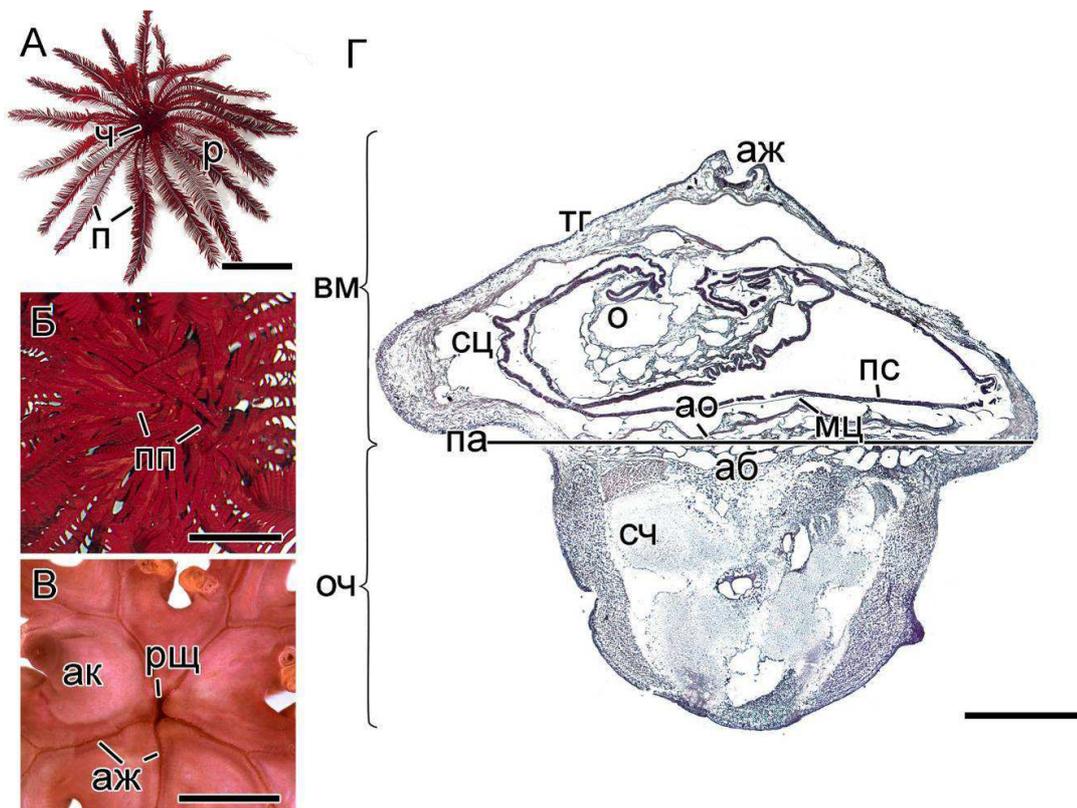


Рис. 1. Строение *Himerometra robustipinna*. А – общий вид; Б – чашечка с опущенными проксимальными пиннулами; В – оральная поверхность висцеральной массы; Г – поперечный срез через чашечку. Условные обозначения: аб – септы аборального целома, аж – амбулакральная желобок, ак – анальный конус, ао – аборальная стенка околкишечного целома, вм – висцеральная масса, мц – мезентерии околкишечного целома, о – осевой орган, п – пиннулы, па – плоскость аутономии, пс – эпителий пищеварительной системы, пп – проксимальные пиннулы, р – руки, рщ – ротовая щель, сц – околкишечный целом, сч – скелетные элементы чашечки, тг – тегмен, ч – чашечка. Масштаб: А – 10 см, Б – 2 см, В – 1 см, Г – 0,5 см

Пищеварительная система *H. robustipinna* представляет собой спирально закрученную трубку и, как и у других морских лилий (Heinzeller, Welsch 1994; Mozzi et al., 2006), состоит из трёх отделов – пищевода, кишечника и прямой кишки (Рис. 2А). Кишечник имеет многочисленные складки – крипты, что характерно для всех видов морских лилий. Наряду с радиальными выростами крипты, вероятно, служат для увеличения площади поверхности пищеварительного эпителия, что повышает эффективность всасывания питательных веществ. Эпителий основного отдела пищеварительной системы, кишечника, состоит из двух типов энтероцитов (Рис. 2Б). Наиболее многочисленный тип клеток – это везикулярные энтероциты. Их отличительной особенностью является большое количество вакуолей с сетчатым содержимым, расположенных в апикальной части клеток (Рис. 2В). По-видимому, везикулярные энтероциты способны синтезировать пищеварительные ферменты. Наличие у них многочисленных микроворсинок указывает на то, что эти клетки осуществляют примембранное пищеварение и всасывание питательных веществ (Филимонова, 1979;

Feral, Massin, 1982). Вторым клеточным типом являются гранулярные энтероциты. Они отличаются наличием в цитоплазме крупных электронно-плотных гранул.

Под базальной мембраной эпителия располагается гемальная лакуна и целомический эпителий (Рис. 2Г). Основу целомического эпителия кишки у *H. robustipinna*, как и у других иглокожих, составляют перитонеальные и миоэпителиальные клетки (Рис. 2Г). У *H. robustipinna* миоэпителиальные клетки образуют мускулатуру пищеварительного тракта, за счёт которой и осуществляется перистальтика кишки.

Кишка и аксиальный орган *H. robustipinna* расположены в околкишечном целоме и отделены от чашечки его аборальной стенкой. Последняя прикрепляется к оральной стороне чашечки только тонкими септами аборального целома (Рис. 1Г). Соединительная ткань этих септ содержит большое число ЮЛК и их отростков (Рис. 3А–В). В цитоплазме ЮЛК обнаруживаются гранулы двух типов. Гранулы первого типа содержат электронно-плотное гомогенное вещество и имеют диаметр 0,2–0,5 мкм. Они представляют собой секреторные гранулы, типичные для ЮЛК иглокожих (Wilkie, 2001). Гранулы второго типа имеют округлую или овальную форму и заполнены гетерогенным содержимым средней электронной плотности. Размер их варьирует от 0,6 до 1 мкм в длину и от 0,3 до 0,8 мкм в ширину. ЮЛК имеют овальные эухромные ядра с ядрышком. Цитоплазма, помимо гранул, содержит многочисленные вытянутые цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР) и митохондрии (Рис. 3Г, Д). Помимо ЮЛК в соединительной ткани септ, как и в тегмене, обнаруживаются склероциты, амебоциты, нервные клетки и пучки аксонов. Достаточно часто аксоны контактируют с отростками ЮЛК.

Таким образом, висцеральная масса и расположенная в ней кишка у *H. robustipinna* имеют типичную для морских лилий организацию. Тем не менее, нами были выявлены особенности строения, которые ранее у морских лилий не отмечались. В первую очередь, это разрастание кишечной трубки на основания рук, в результате чего висцеральная масса приобретает пятилопастную форму. Функция этих радиальных выростов, по-видимому, состоит в увеличении длины пищеварительного тракта, что должно способствовать более полному перевариванию пищи. Кроме того, у *H. robustipinna* имеются особенности прикрепления кишки к чашечке, которые, вероятно, способствуют аутономии внутренних органов. Стенка околкишечного целома соединяется с чашечкой с помощью многочисленных тонких септ. Последние, очевидно, могут легко разрываться при внешнем воздействии. Фактически пространство между аборальной стенкой околкишечного целома и оральной стороной чашечки можно рассматривать как плоскость аутономии, место, где ослаблена механическая связь этих частей организма.

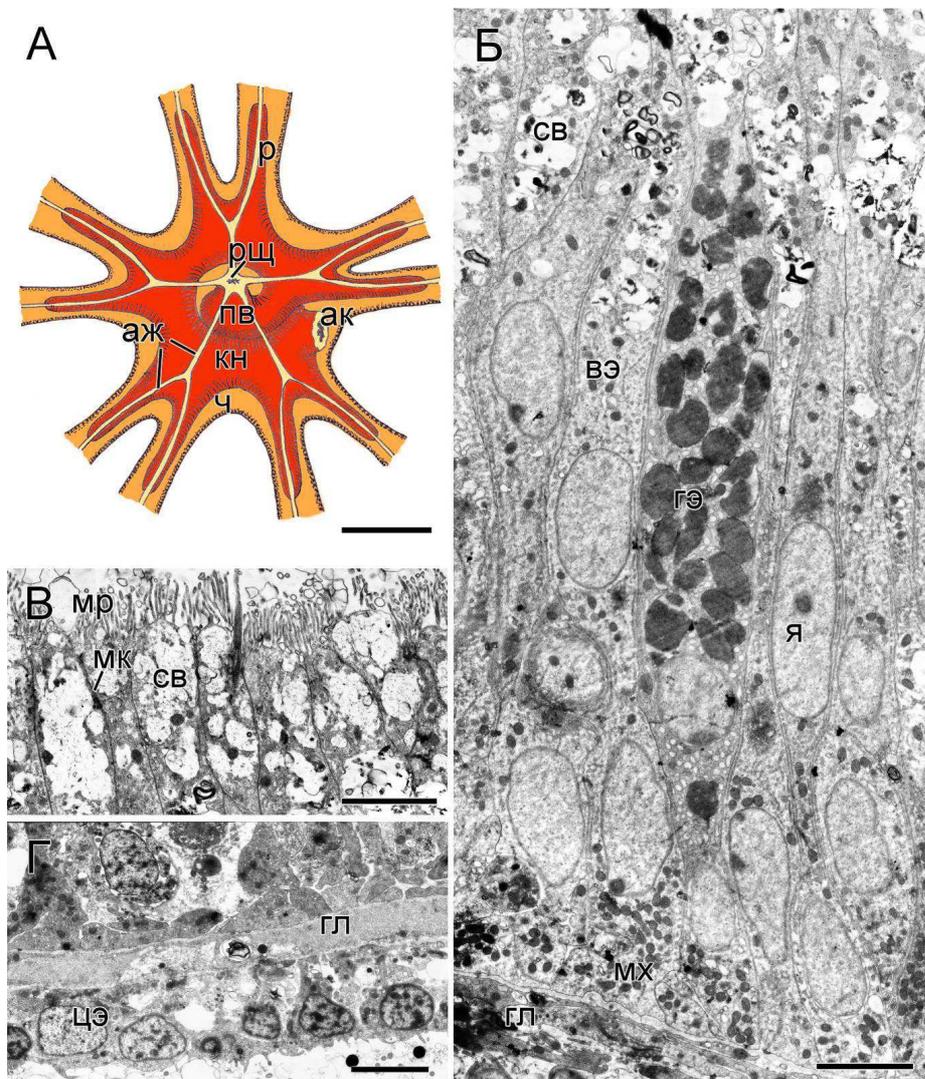


Рис. 2. Строение кишки *Himerometra robustipinna*. А – схема строения пищеварительной системы; Б – общий вид кишечного эпителия; В – апикальная часть энтероцитов; Г – целомический эпителий кишки. Условные обозначения: аж – амбулакральный желобок, ак – анальный конус, вэ – везикулярный энтероцит, гл – гемальная лакуна, гэ – гранулярный энтероцит, кн – кишечник, мк – межклеточные контакты, мр – микроворсинки, мх – митохондрии, пв – пищевод, р – руки, рш – ротовая щель, св – секреторные вакуоли, цэ – целомический эпителий, ч – чашечка, я – ядро. Масштаб: А – 0,5 см, Б – 4 мкм, В – 2 мкм, Г – 4 мкм.

2. Аутономия висцеральной массы у *Himerometra robustipinna*

При отделении висцеральной массы особи *H. robustipinna* проявляют чётко выраженные поведенческие реакции. При захвате висцеральной массы пинцетом происходит мгновенное опускание проксимальных пиннул, прикрывающих оральную сторону чашечки. В естественных условиях такая реакция, видимо, защищает животное от утраты внутренностей (Meyer, 1985). Если продолжать удерживать висцеральную массу, то через 20–30 секунд проксимальные пиннулы расходятся в стороны, раскрывая чашечку (Рис. 4А). К этому моменту висцеральная масса уже отделена и свободно удаляется (Рис. 4Б, В).

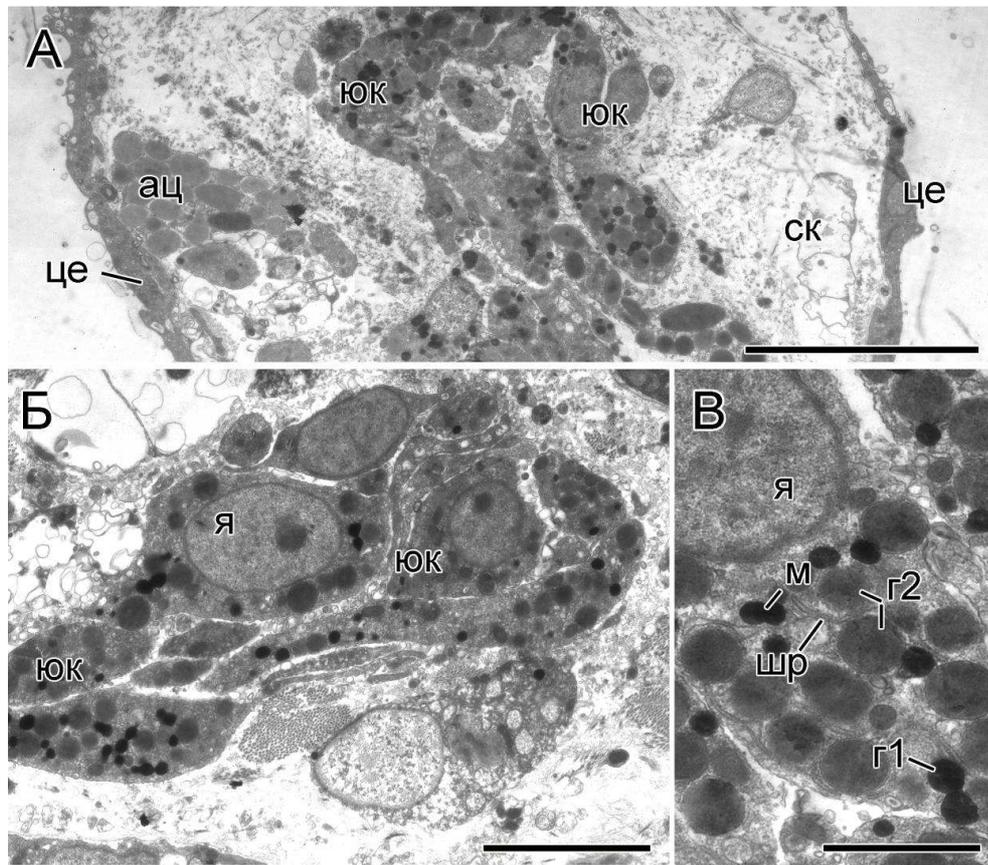


Рис. 3. Особенности строения септ аборального целома у *Himerometra robustipinna*. А – поперечный срез септы; Б – скопление ЮЛК в соединительной ткани септы; В – гранулы ЮЛК. Условные обозначения: ам – амёбоцит, г1 – гранулы ЮЛК первого типа, г2 – гранулы ЮЛК второго типа, мх – митохондрия, ск – секреторная клетка, це – клетка целомического эпителия, шр – ШЭР, юк – ЮЛК, я – ядро. Масштаб: А – 10 мкм, Б – 4 мкм, В – 1 мкм.

При удалении внутренних органов происходит разрыв тегмена по периферии чашечки и разрушение септ аборального целома. В результате этого висцеральная масса удаляется целиком, аборальная стенка околкишечного целома и кишечник не повреждаются (Рис. 5А–Г). На поверхности чашечки сохраняются только оборванные септы аборального целома (Рис. 5В, Д, Е). В процессе аутомии происходят изменения в строении ЮЛК. Их гранулы первого типа увеличиваются в размерах и окружаются электронно-прозрачным ореолом (Рис. 5Ж). Гранулы выбрасываются во внеклеточное пространство (Рис. 5З) и вокруг них часто отмечаются области бесструктурного матрикса, не содержащие коллагеновых волокон (Рис. 5И). Изменения в ЮЛК и соединительной ткани указывают на то, что юксталигаментная система участвует в отделении висцеральной массы у данного вида. Вероятно, как и у других иглокожих (Koob et al., 1999), вещества, содержащиеся в гранулах, разрушают коллаген и уменьшают прочность соединительной ткани септ, в результате чего они разрушаются. Сходные морфологические картины наблюдаются при аутомии рук у морской лилии *Florometra serratissima* (Holland, Grimmer, 1981).

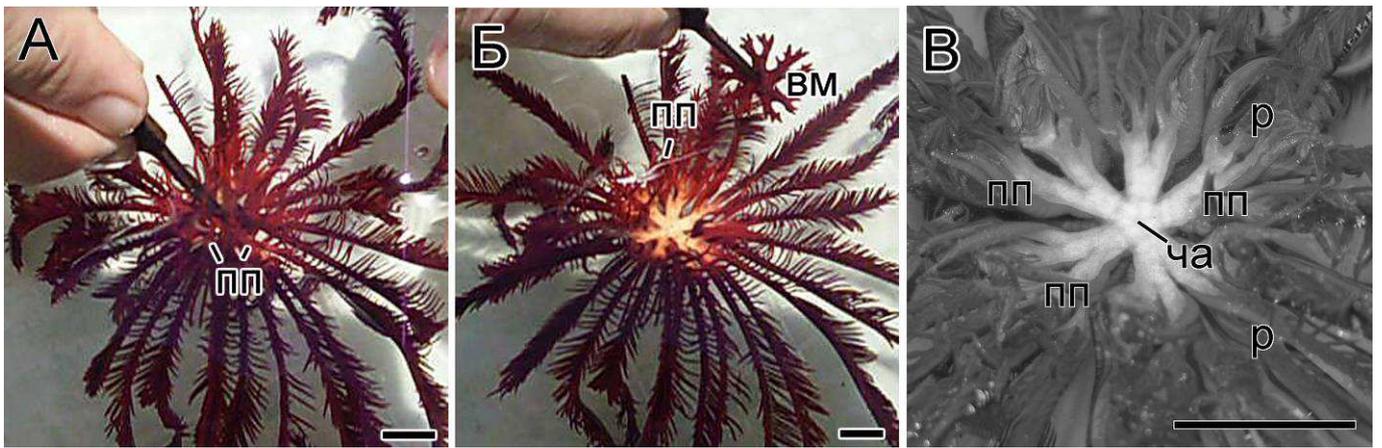


Рис. 4. Отделение висцеральной массы у *Himerometra robustipinna* в результате механического воздействия. А – животное с поднятыми проксимальными пиннулами через 30 с после захвата, Б – отделение висцеральной массы, В – общий вид животного сразу после удаления висцеральной массы. Условные обозначения: вм – висцеральная масса, пп – проксимальные пиннулы, р – руки, ча – чашечка. Масштаб: А–В – 2 см.

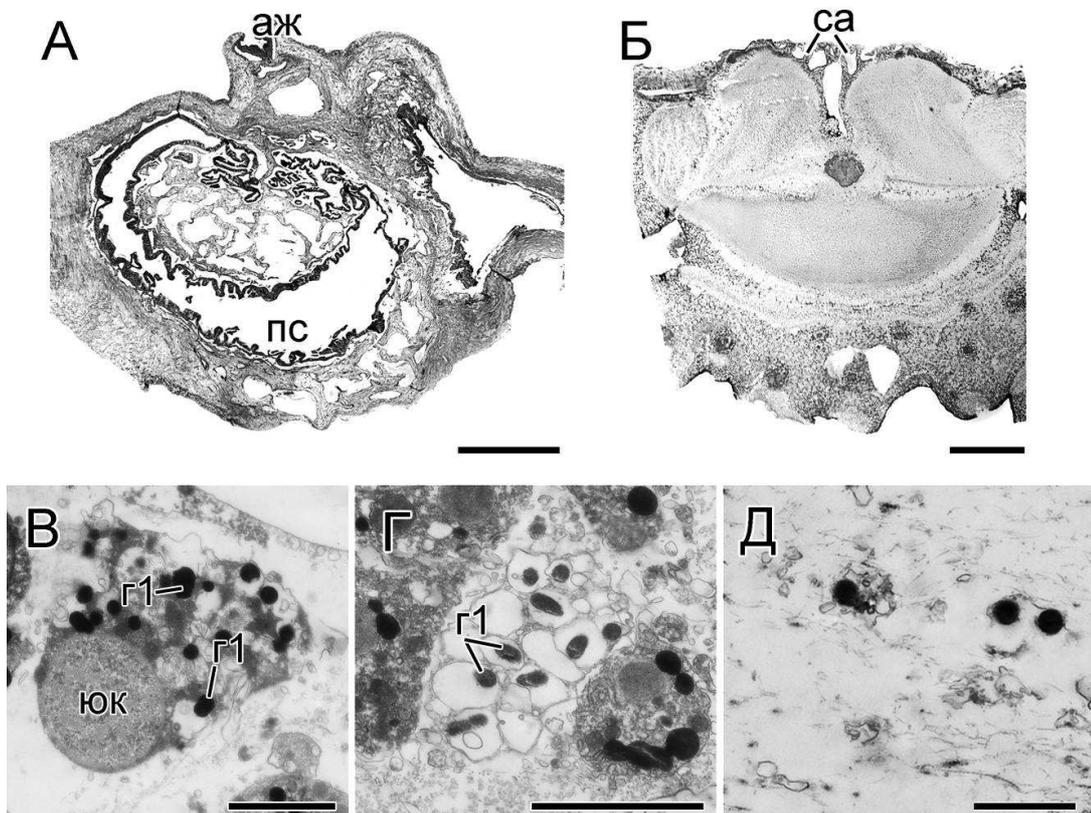


Рис. 5. Особенности аутономии висцеральной массы у *Himerometra robustipinna*. А – поперечный срез через висцеральную массу сразу после аутономии, Б – поперечный срез чашечки сразу после удаления висцеральной массы; В – ЮЛК с видоизмененными гранулами первого типа; Г – гранулы первого типа ЮЛК с электронно-прозрачным ореолом; Д – гранулы ЮЛК первого типа в соединительной ткани септ. Условные обозначения: аж – амбулакральная желобок, г1 – гранулы первого типа юксталигамментных клеток, са – септы аборальной целома, юк – ЮЛК. Масштаб: А, Б – 100 мкм, В, Г – 2 мкм.

Таким образом, отделение висцеральной массы у *H. robustipinna* характеризуется всеми основными признаками настоящей аутомии. Это, в первую очередь, защитная реакция, призванная снижать степень повреждения организма в результате внешнего воздействия. Во-вторых, удаление висцеральной массы осуществляется за счет внутренних механизмов самого животного, в частности при участии юксталигаментных клеток. Кроме того, отделение внутренностей находится под контролем нервной системы. На это указывают сложные поведенческие реакции животного, большое число отростков нервных клеток в соединительной ткани тегмена и мезентериев аборального целома, а также близкое расположение аксонов и отростков ЮЛК.

3. Регенерация пищеварительной системы у *Himerometra robustipinna*

Особенностью регенерации висцеральной массы у морской лилии *H. robustipinna* является высокая скорость процесса. Уже через 4 суток после полного удаления внутренних органов у животного имеются ротовое отверстие и анальный конус. Это означает, что к этому моменту пищеварительная система, в основном, сформирована и в дальнейшем происходит только рост кишки и специализация энтероцитов. Последовательные этапы регенерации пищеварительной системы у *H. robustipinna* показаны на схеме (Рис. 6). Весь процесс восстановления можно разделить на три стадии.

Первая стадия (0–12 ч после аутомии). Одним из важнейших событий рассматриваемого периода следует считать изоляцию оставшихся внутренних органов от внешней среды (рис. 6А–Г). У многих животных большую роль в этом играет образование тромба за счет коагуляции полостных жидкостей (целомической, гемальной и др.) и слипания блуждающих клеток или клеток крови (Лиознер, 1982; Карлсон, 1986). В дальнейшем тромб разрушается (Карлсон, 1986; Dolmatov, 1992; Короткова, 1997). У *H. robustipinna* сразу после аутомии на поверхности чашечки также формируется слой коагулировавшей целомической жидкости, который в течение первых 6 ч заменяется рыхлым скоплением амебоцитов и мигрирующих ЮЛК (Рис. 7А). Скопление клеток, образующееся на поверхности чашечки, вероятно, выполняет двойную функцию. С одной стороны, оно служит в качестве тромба, изолируя внутренние области чашечки от внешней среды. С другой – является местом формирования висцеральной массы. ЮЛК уже через 6 ч после аутомии показывают первые признаки трансдифференцировки, которые выражаются в разрушении гранул второго типа (Рис. 7Б).

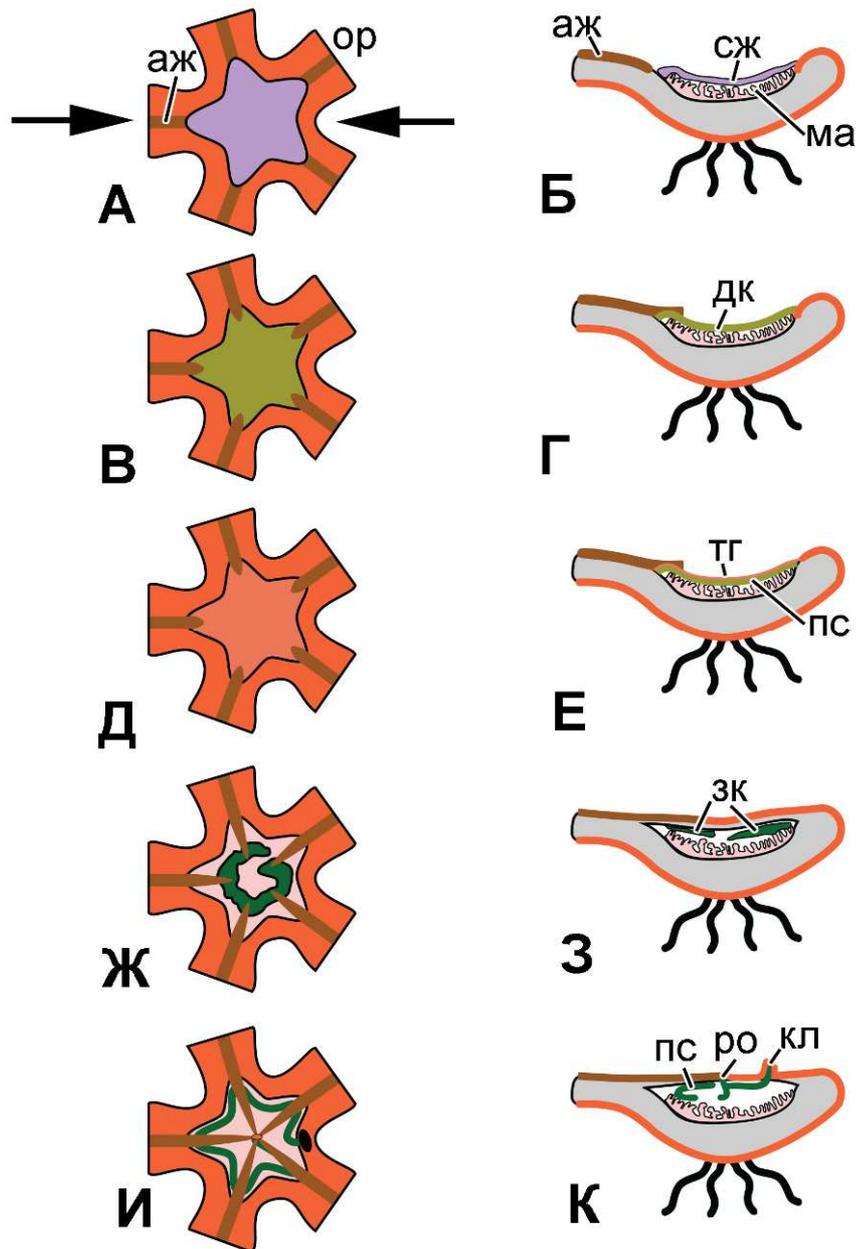


Рис. 6. Схема последовательных этапов регенерации кишки у *Himerometra robustipinna*. А, В, Д, Ж, И – вид сверху, Б, Г, Е, З, К – поперечный срез (плоскость разреза указана стрелками). А, Б. Формирование рыхлого слоя клеток через 6 ч после аутомии. В, Г. Формирование плотного слоя клеток через 12 ч после аутомии. Д, Е. Разделение слоя клеток на две части через 18 ч после аутомии. Ж, З. Формирование зачатка кишки через 24 ч после аутомии. И, К. Формирование пищеварительной системы через 2–4 суток после аутомии. Условные обозначения: аж – амбулакральнй желобок; дж – слой дедифференцированных клеток; зк – зачаток кишки; кл – клоака; ма – мезентерии аборального целома; ор – основание руки; пс – пищеварительная система; пс – слой формирования пищеварительной системы, ро – ротовое отверстие, сж – слой коагулировавшей целомической жидкости; тг – слой формирования тегмена, ц – цирры; э – эпидермис. На Ж и И тегмен не показан.

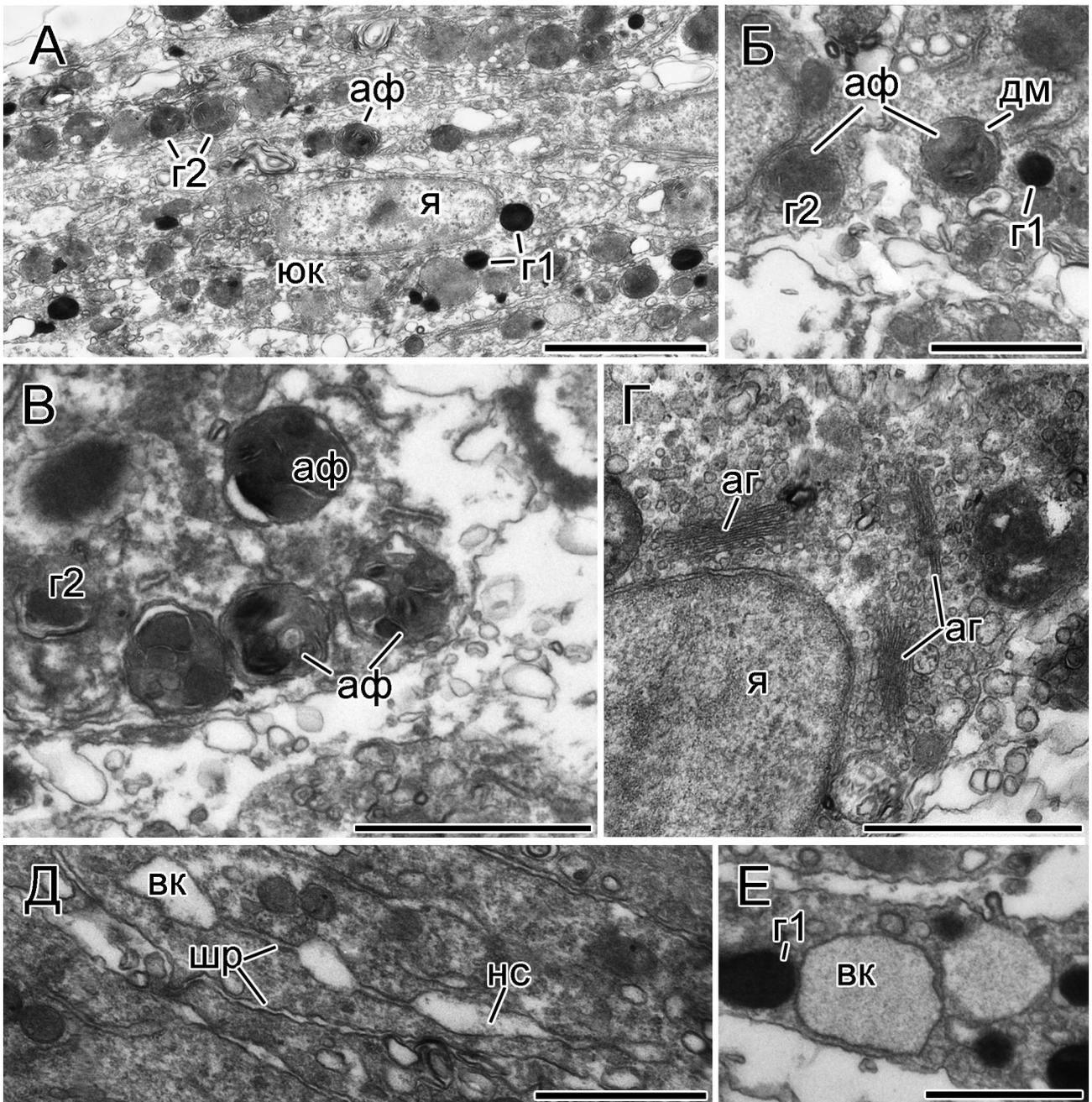


Рис. 7. Изменения, происходящие в ЮЛК на первой стадии регенерации. А – скопление ЮЛК на поверхности чашечки через 6 ч после аутоотомии, Б – начало формирования аутофагосом с гранулами второго типа через 6 ч после аутоотомии, В – изменения в гранулах второго типа через 6 ч после аутоотомии, Г – аппарат Гольджи в ЮЛК через 12 ч после аутоотомии, Д – синтез секрета в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме в цитоплазме ЮЛК через 12 ч после аутоотомии, Е – вакуоли с сетчатым секретом в цитоплазме ЮЛК через 12 ч после аутоотомии. Условные обозначения: аг – аппарат Гольджи, аф – аутофагосомы, вк – вакуоли с сетчатым секретом, г1 – гранулы первого типа в цитоплазме ЮЛК, дм – двойная мембрана аутофагосомы, м – миоэпителиальная клетка, нс – начало синтеза сетчатого секрета, шр – шероховатый эндоплазматический ретикулум, юк – юксталигаментная клетка, я – ядро. Масштаб: А – 2 мкм, Б – 1 мкм, В – 1 мкм, Г – 2 мкм, Д – 1 мкм, Е – 1 мкм.

Эти гранулы окружаются двойной мембраной и преобразуются в аутофагосомы. Содержимое гранул приобретает гетерогенную структуру (Рис. 7В). Одновременно с разрушением гранул происходит активация синтетического аппарата ЮЛК. Через 12 ч после аутономии в их цитоплазме увеличивается число цистерн ШЭР и свободных рибосом, в околядерной части клеток обнаруживается хорошо развитый аппарат Гольджи (АГ) (Рис. 7Г). В ШЭР происходит синтез и накопление вещества низкой электронной плотности с сетчатой структурой (Рис. 7Д). В результате этого в цитоплазме ЮЛК появляются большие вакуоли неправильной формы, содержащие это вещество (Рис. 7Е). Такие секреторные вакуоли характерны для энтероцитов неповреждённой кишки *H. robustipinna*. Гранулы первого типа на данном этапе остаются неизменными (Рис. 7Е). С периферии чашечки, из неповрежденных районов, начинается миграция эпидермальных клеток, которые постепенно покрывают всю оральную сторону чашечки.

Вторая стадия (18–24 ч после аутономии). Эта стадия характеризуется началом восстановительных процессов. Скопление клеток на поверхности чашечки разделяется на два слоя (Рис. 6Д–З, 8А). Наружный представляет собой будущий тегмен. Его эпидермис ещё состоит из дедифференцированных уплощённых клеток, однако под ним уже начинается формирование соединительной ткани. Внутренний слой является зачатком кишки. В нем происходит образование пищеварительной выстилки. ЮЛК собираются в плотные скопления. В их цитоплазме увеличивается число секреторных вакуолей (Рис. 8Б, В). На этой стадии идёт разрушение амёбоцитов и активное поглощение их гранул всеми типами клеток, участвующих в регенерации. Вероятно, вещество гранул содержит факторы, вызывающие дедифференцировку клеток иглокожих. Через 24 ч после аутономии ЮЛК утрачивают мезенхимные черты организации и приобретают эпителиальные. В этой связи такие клетки теперь правильнее называть не «ЮЛК», а «предшественники энтероцитов». Они связаны друг с другом септированными контактами. Поверхность клеток, обращенная в полость скопления (апикальная поверхность клетки), несет микроворсинки (Рис. 8Г). Гранулы второго типа исчезают, в цитоплазме предшественников энтероцитов можно увидеть только остаточные тельца аутофагосом. Тем не менее, на данном этапе регенерации в их цитоплазме все еще сохраняются гранулы первого типа. Кроме того, предшественники энтероцитов содержат большое число гранул амёбоцитов.

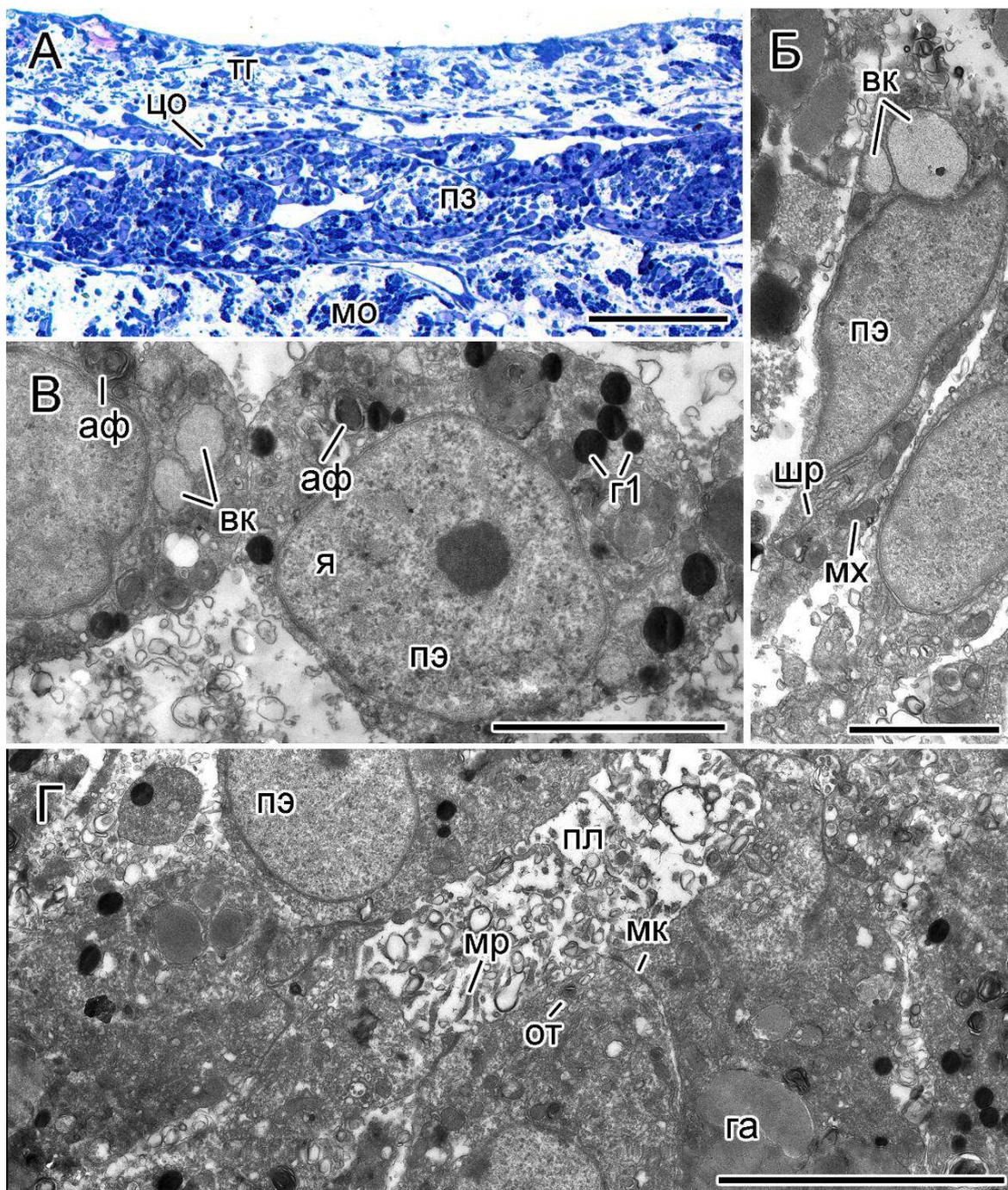


Рис. 8. Зачаток висцеральной массы *Himerometra robustipinna* на второй стадии регенерации. А – общий вид зачатка через 18 ч после аутоотомии, Б, В – предшественники энтероцитов через 18 ч после аутоотомии, Г – зачаток кишки через 24 ч после аутоотомии. Условные обозначения: аф – автофагосома, вк – вакуоли с сетчатым секретом, г1 – гранулы юксталигаментных клеток первого типа, га – гранулы амёбоцитов, мк – межклеточные контакты, мо – мезентерии окологлазничного целома, мр – микроворсинки, мх – митохондрии, от – остаточное тельце автофагосомы, пз – зачаток пищеварительной системы, пл – полость пищеварительной системы, пэ – предшественник энтероцитов, тг – зачаток тегмена, цэ – целомический эпителий, шр – шероховатый эндоплазматический ретикулум, цо – целомический эпителий окологлазничного целома, я – ядро. Масштаб: А – 50 мкм, Б – 1 мкм, В – 2 мкм, Г – 1 мкм, Д – 4 мкм.

Третья стадия (2–4 суток после аутономии) характеризуется активным морфогенезом. Через 2 суток после повреждения амбулакральные желобки достигают середины чашечки (Рис. 6И). Клетки эпителия амбулакральных желобков начинают специализироваться. На их апикальной поверхности появляются реснички и микроворсинки. Кроме того, в эпителии имеются бокаловидные слизистые клетки, характерные для него в норме. Несмотря на дифференцировку, некоторые клетки митотически делятся. Под тегменом продолжается формирование пищеварительной системы. За счет слияния размеры скоплений предшественников энтероцитов увеличиваются. Составляющие их клетки упорядочиваются и образуют настоящий эпителий (Рис. 9А). На апикальной поверхности клеток увеличивается число микроворсинок. Эпителий отделяется от окружающей соединительной ткани хорошо выраженной базальной мембраной. В клетках-предшественниках увеличивается число мембран ШЕР. В апикальной части цитоплазмы возрастает число секреторных вакуолей, свойственных зрелым энтероцитам. Гранулы первого типа в цитоплазме предшественников энтероцитов больше не выявляются.

Через 4 суток после аутономии клеточные скопления объединяются, формируя единую кишечную выстилку. К этому моменту все структуры пищеварительной системы (ротовое отверстие, кишечный эпителий, анальный конус с анальным отверстием) уже сформированы (рис. 6И, К). В зачатке кишки имеется полноценный пищеварительный эпителий (Рис. 9Б). Он образует складки, характерные для кишки в норме. Кишечный эпителий состоит из дифференцированных везикулярных энтероцитов, среди которых встречаются гранулярные энтероциты (Рис. 9В). Апикальная поверхность клеток несет многочисленные микроворсинки, каждая клетка имеет ресничку. Митохондрии располагаются в базальной части цитоплазмы энтероцитов. Между целомическим эпителием и кишечной выстилкой появляются гемальные лакуны. Наличие специализированных клеток в пищеварительном эпителии и формирование всех остальных структур пищеварительной системы дает возможность предположить, что животное через 4 суток после аутономии уже способно питаться. Тем не менее, высота кишечной выстилки составляет только 10 мкм, что намного меньше нормы. В дальнейшем происходит рост и увеличение линейных размеров висцеральной массы. Сходные стадии восстановления были выделены при изучении регенерации висцеральной массы у морской лилии *Antedon mediterranea* (Mozzi et al., 2006).

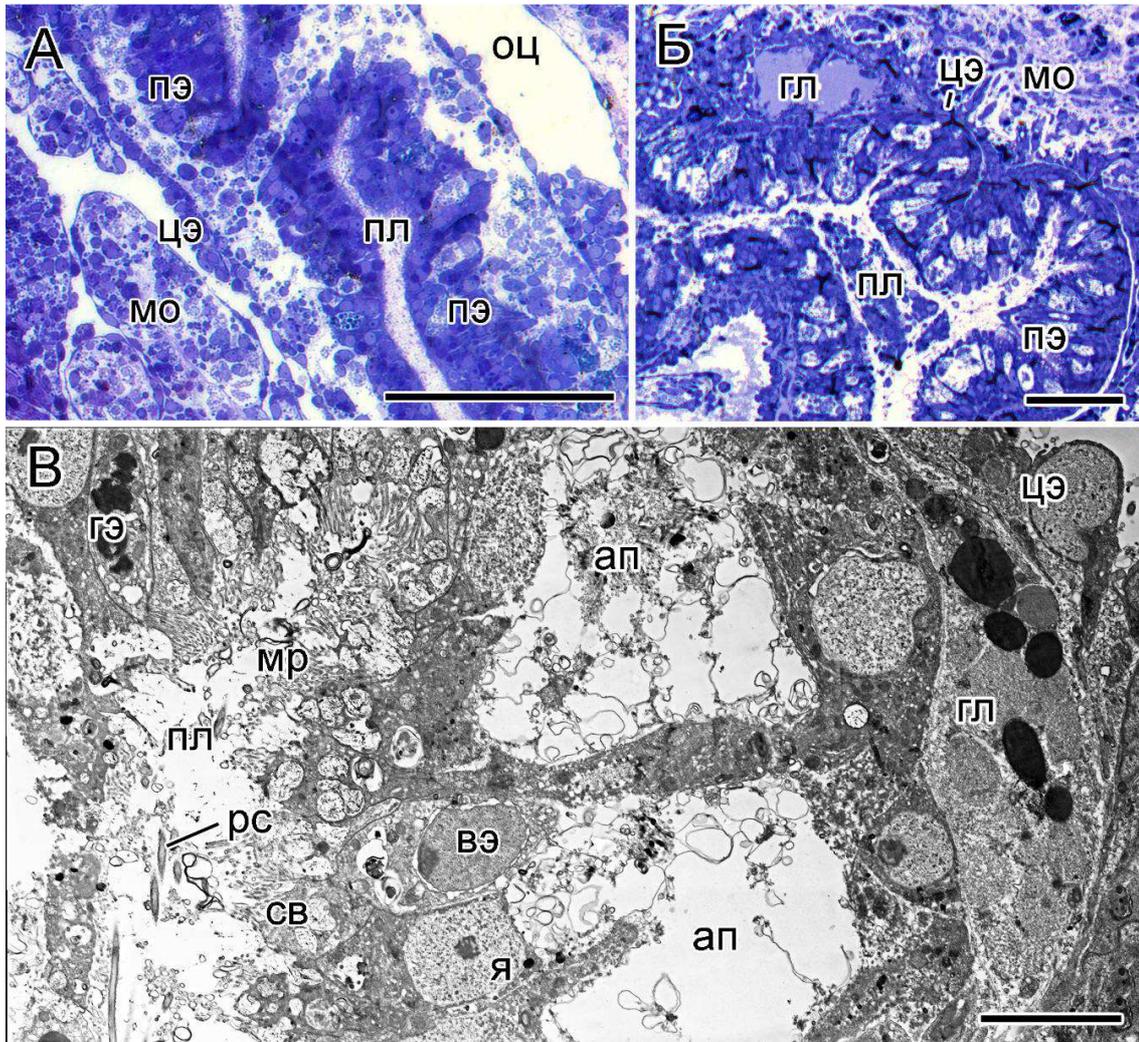


Рис. 9. Зачаток кишки *Himerometra robustipinna* на третьей стадии регенерации. А – зачаток пищеварительной системы через 2 суток после аутоотомии, Б – зачаток пищеварительной системы через 4 суток после аутоотомии, В – пищеварительный эпителий через 4 суток после аутоотомии. Условные обозначения: ап – полости, оставшиеся от разрушившихся клеток, вэ – везикулярный энтероцит, гл – гемальная лакуна, гэ – гранулярный энтероцит, пэ – пищеварительный эпителий, мр – микроворсинки, оц – полость околкишечного целома, пл – полость пищеварительной системы, пэ – пищеварительный эпителий, рс – ресничка, св – вакуоли с сетчатым секретом, мо – мезентерии околкишечного целома, цэ – целомический эпителий, эц – энтероцит, я – ядро. Масштаб: А – 20 мкм, Б – 10 мкм, В – 4 мкм.

В нашем исследовании было показано, что при аутоотомии висцеральной массы у морской лилии *H. robustipinna* кишка удаляется полностью и животное теряет все ткани энтодермального происхождения. Таким образом, энтероциты должны возникать либо из стволовых клеток, либо из дифференцированных клеток мезодермального или эктодермального происхождения. Несмотря на многочисленные попытки, стволовые клетки у иглокожих до сих пор не обнаружены (Долматов, Машанов, 2007; Vogt, 2012). Показано, что хорошие восстановительные способности этих животных обусловлены легкостью дедифференцировки специализированных клеток (Долматов, Машанов, 2007; García-Arrarás, Dolmatov, 2010). Кроме того, в некоторых случаях имеет место

трансдифференцировка (Mashanov et al., 2005). Вероятно, за счет трансформации клеток целомического эпителия образуется кишечная выстилка у морской лилии *A. mediterranea* (Mozzi et al., 2006).

При восстановлении кишки у *H. robustipinna* мы обнаружили активное участие ЮЛК в процессах регенерации. До настоящего времени считалось, что ЮЛК – это специализированный тип клеток, свойственный только иглокожим, функцией которых является изменение механических свойств соединительной ткани при аутомии (Wilkie, 2001). Однако по нашим данным у *H. robustipinna* ЮЛК не только принимают участие в аутомии, но и являются источником клеток при формировании кишечной выстилки. Такая бифункциональность ЮЛК меняет наши представления о природе этих клеток. Из-за отсутствия данных пока невозможно сказать, какая из функций ЮЛК, изменение внеклеточного матрикса или источник клеток для регенерации, является первичной. Тем не менее, анализ литературы показывает, что функции ЮЛК в разных классах Echinodermata несколько различаются. Это даёт основание предположить, что роль этих клеток в жизнедеятельности иглокожих менялась в процессе эволюции. В отличие от морских лилий в остальных группах иглокожих ЮЛК более тесно ассоциируются с нервной системой (Wilkie, 2001). У голотурий ЮЛК, по-видимому, вообще не участвуют в аутомии внутренних органов (Bugne, 2001).

При изучении регенерации кишки у *H. robustipinna* мы не смогли обнаружить признаков пролиферативной активности ЮЛК. Вероятно, увеличение числа клеток, формирующих зачаток кишки, происходит исключительно за счет их миграции из септ аборального целома. Возможно, что отсутствие пролиферативной активности является одним из механизмов ускорения темпов восстановления, поскольку увеличение числа клеток в месте повреждения быстрее происходит именно за счет миграции, а не пролиферации. Интересно, что у морской лилии *A. mediterranea* регенерация кишки сопровождается заметной пролиферативной активностью (Mozzi et al., 2006). Митотически делящиеся клетки выявляются даже обычными методами электронной микроскопии. Однако, несмотря на высокую пролиферативную активность, темпы регенерации у данного вида ниже, чем у *H. robustipinna*. У *A. mediterranea* кишечная выстилка начинает развиваться только через 3 суток после повреждения, а дифференцировка энтероцитов отмечается через 5 суток регенерации. Тем не менее, полностью исключить наличие пролиферативной активности при регенерации кишки у *H. robustipinna* при использовании только морфологических методов нельзя. В этой связи необходимы дальнейшие

исследования с использованием специфических методик.

Остальные структуры пищеварительной системы *H. robustipinna*, такие как амбулакральные желобки и целомический эпителий, восстанавливаются за счёт собственных клеточных источников, что характерно для иглокожих (Долматов, Машанов, 2007; Biressi et al., 2010).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении морской лилии *H. robustipinna* нами были выявлены некоторые анатомические особенности строения пищеварительной системы, которые ранее у морских лилий не отмечались. В первую очередь, это разрастание кишечной трубки на основаниях рук, в результате чего висцеральная масса приобретает пятилопастную форму. Нами было показано, что радиальные выросты висцеральной массы содержат кишку и, соответственно, являются частью пищеварительной системы. Функция этих радиальных выростов, по-видимому, состоит в увеличении длины пищеварительного тракта, что должно способствовать более полному перевариванию пищи. Кроме того, обнаружено, что стенка околкишечного целома соединяется с чашечкой с помощью многочисленных тонких септ. Последние содержат юксталигаментные клетки и, очевидно, могут легко разрываться при внешнем воздействии.

Нами впервые показано, что отделение висцеральной массы у *H. robustipinna* характеризуется всеми основными признаками настоящей аутомии. Это, в первую очередь, защитная реакция, призванная снижать степень повреждения организма в результате внешнего воздействия. Во-вторых, удаление висцеральной массы осуществляется за счёт внутренних механизмов самого животного, в частности при участии юксталигаментной системы. Кроме того, отделение внутренностей находится под контролем нервной системы.

Впервые показано, что основными механизмами восстановления кишки у *H. robustipinna* являются миграция и трансдифференцировка юксталигаментных клеток. Регенерация после аутомии у *H. robustipinna* протекает очень быстро и уже через 4 суток после полного удаления висцеральной массы у животного имеется функционирующая пищеварительная система. Впервые установлено, что амбулакральные желобки регенерируют в результате частичной дедифференцировки, миграции и пролиферации собственных клеток, сохранившихся в основании рук. Целомический эпителий околкишечного целома формируется из клеток целомического эпителия септ аборального целома.

ВЫВОДЫ

1. Висцеральная масса *Himerometra robustipinna* имеет типичное для бесстебельчатых морских лилий макро- и микроанатомическое строение. Она покрыта тегменом, состоящим из эпидермиса и слоя соединительной ткани. Пищеварительная трубка располагается в хорошо выраженном околокишечном целоме и анатомически разделяется на три части: пищевод, кишечник и прямая кишка. Стенка околокишечного целома прикрепляется к оральной стороне чашечки с помощью многочисленных септ аборального целома.
2. Кишечный эпителий *Himerometra robustipinna* представлен двумя типами энтероцитов. Преобладающий тип, везикулярные энтероциты, характеризуется наличием в апикальной части клетки крупных секреторных вакуолей. Гранулярные энтероциты содержат в цитоплазме крупные гетерогенные электроноплотные гранулы, окружённые мембраной.
3. Процесс отделения висцеральной массы у *Himerometra robustipinna* является истинной аутономией. Он сопровождается сложными поведенческими реакциями, в нём задействованы специфические механизмы, изменяющие прочность соединительной ткани, отделение происходит в строго определённом месте. При аутономии удаляются все ткани энтодермального происхождения.
4. Регенерация кишки у *Himerometra robustipinna* после аутономии занимает около четырёх суток. Процесс восстановления можно разделить на 3 стадии: закрытие раны (0–12 ч после аутономии); начало восстановительных процессов (18–24 ч после аутономии); активный морфогенез (2–4 суток после аутономии). В дальнейшем происходит постепенный рост висцеральной массы.
5. Основными механизмами регенерации кишечной выстилки у *Himerometra robustipinna* являются миграция и трансдифференцировка юксталигаментных клеток. Остальные структуры пищеварительной системы (амбулакральные желобки и целомический эпителий) формируются за счёт собственных клеток, сохранившихся после аутономии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. **Bobrovskaya N.V.**, Dolmatov I.Yu. Autotomy of the visceral mass in the feather star *Himerometra robustipinna* (Crinoidea, Comatulida) // Biological Bulletin. 2014. V. 226. P. 81 – 91.
2. Долматов И.Ю., **Бобровская Н.В.**, Гирич А.С. Иглокожие как модельные объекты для изучения механизмов регенерации // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3: Биология. 2014. № 3. С. 96–112.

Работы в сборниках трудов и материалах конференций:

3. **Bobrovskaya N.V.**, Dolmatov I.Yu. Autotomy and regeneration of digestive system in *Himerometra robustipinna* // 14th International Echinoderm Conference: 2012 Conference booklet. Brussel, 2012. P. 90.
4. **Бобровская Н.В.**, Долматов И.Ю. Регенерация пищеварительной системы морской лилии *Himerometra robustipinna* после аутомии // Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов. Материалы Всероссийской конференции с международным участием. Борок: Изд-во ФГБУН ИБВВ, 2012. С. 51–54.
5. **Бобровская Н.В.**, Долматов И.Ю. Ультраструктурные особенности регенерации пищеварительной системы морской лилии *Himerometra robustipinna* после аутомии // Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция. Всероссийская конференция с международным участием. Санкт-Петербург, 2013. С. 109–110.

Надежда Владимировна Бобровская

Механизмы аутономии и регенерации пищеварительной системы
у морской лилии *Himerometra robustipinna*

03.03.05 – биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук