

На правах рукописи

КАМЕНЕВ  
Ярослав Олегович

**УЛЬТРАСТРУКТУРА ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ, БЕСПОЛОЕ  
РАЗМНОЖЕНИЕ И РЕГЕНЕРАЦИЯ У ГОЛОТУРИИ  
*CLADOLABES SCHMELTZII***

03.03.05 – биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Владивосток – 2013

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:**

Дроздов Анатолий Леонидович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, главный научный сотрудник лаборатории эмбриологии

Токмакова Наталья Павловна, кандидат биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования «Дальневосточный федеральный университет», доцент кафедры клеточной биологии и генетики

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита диссертации состоится 20 декабря 2013 г. в 14 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 (690041, Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17).

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

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

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Автореферат разослан

19 ноября 2013 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

*Вашенко*

М.А. Вашенко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Важнейшим свойством всех живых существ является их способность восстанавливать свою целостность после различных повреждений. Такая адаптация позволяет организмам лучше приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды. Изучение различных проблем регенерации продолжается уже более 200 лет, однако многие из них до сих пор далеки от своего решения. В частности, плохо исследована взаимосвязь регенерации и бесполого размножения. Очень часто развитие органов при бесполом размножении обозначают термином «регенерация» (Воронцова, Лиознер, 1957). Однако до сих пор не ясна связь этих двух морфогенезов. Не понятно, являются ли механизмы развития при бесполом размножении производными от восстановительных механизмов или же наоборот, регенерация возникла на основе бесполого размножения (Долматов, 1996; Bely, Nyberg, 2010; Bely, Sikes, 2010). Существуют виды животных, которые способны к бесполому размножению, но не могут регенерировать органы после их искусственного удаления (Kobatake, Sugiyama, 1989; Bely, Sikes, 2010).

Для решения этих и многих других проблем теории регенерации необходимы модельные объекты, обладающие способностью к различным морфогенезам. В этом отношении удобными модельными объектами, на наш взгляд, являются иглокожие. Тип Echinodermata – это древняя группа беспозвоночных, первые представители которой появились более 450 млн лет назад (Swalla, Smith, 2008). Они принадлежат к группе вторичноротых и, соответственно, имеют общего предка с позвоночными животными. Среди иглокожих наиболее разнообразными восстановительными реакциями обладают голотурии (Долматов, 1999; Candia Carnevali, 2006). Они способны регенерировать как небольшие придатки, например, щупальца и амбулакральные ножки, так и целые системы органов и части тела. Кроме того, у некоторых видов голотурий имеется бесполое размножение путем поперечного деления. В этой связи они являются удобными объектами для сравнительного анализа механизмов развития при бесполом размножении и регенерации. Многие аспекты регенерации кишки и передних структур у голотурий после эвисцерации хорошо изучены (Долматов, Машанов, 2007; Долматов, 2009; Mashanov, Garcia-Arregas,

2011). В то же время регенерация после поперечного разрезания, процесса, наиболее близкого к формированию утраченных структур при бесполом размножении, практически не исследована. В настоящий момент имеется только одна статья, опубликованная более 100 лет назад, в которой констатируется наличие способности к восстановлению после такой операции для двух видов голотурий (Torelle, 1910). Кроме того, полностью отсутствуют исследования клеточных механизмов формирования внутренних органов при бесполом размножении. Имеющиеся описания очень кратки и касаются только макроморфологии (Mladenov, Emson, 1990; Conand, 1996; Conand et al, 1997).

Недавно нами было установлено, что обитающая в Южно-Китайском море голотурия *Cladolabes schmeltzii* имеет интересные особенности – она способна регенерировать после поперечного разрезания. Кроме того, в природных популяциях очень часто встречаются животные с регенерирующим передним или задним концом. Предварительный морфологический анализ таких голотурий показал, что разделение тела у них происходило примерно в одном и том же месте. Этот факт с большой долей вероятности указывает на наличие у данного вида процесса бесполого размножения путем поперечного деления. Голотурия *C. schmeltzii* широко распространена в Тихом океане, ее ареал простирается от южных берегов Китая до Австралии. Тем не менее, она до сих пор не исследована. Имеется только краткое описание внешней морфологии и некоторых внутренних органов, сделанных для определения таксономического положения данного вида (Massin, 1999).

**Целью** данной работы является изучение особенностей бесполого размножения и регенерации у голотурии *Cladolabes schmeltzii*.

**Задачи** исследования включали: (1) изучение основных органов *C. schmeltzii* в норме; (2) изучение особенностей деления при бесполом размножении у *C. schmeltzii*; (3) выявление механизмов регенерации переднего и заднего отделов тела при бесполом размножении и после поперечного разрезания у данного вида голотурий.

**Научная новизна.** Получены новые данные по морфологии основных систем органов голотурии *C. schmeltzii* в норме и в процессе развития при бесполом размножении и после поперечного разрезания, как на световом, так и на ультраструктурном уровне.

Впервые для данного вида изучено микроскопическое строение нервной, мышечной, амбулакральной, пищеварительной и дыхательной систем. Показано, что эти системы у *C. schmeltzii* имеют типичную для голотурий гистологическую и микроанатомическую организацию.

Впервые для голотурий подробно изучено строение начальных отделов пищеварительного тракта. Установлено наличие в выстилке глотки, пищевода и желудка заклепкоподобных (rivet-like) контактов. Ранее подобные структуры были описаны только для наружного эпидермиса некоторых морских лилий и офиур. Их наличие у *C. schmeltzii* свидетельствует об эктодермальном происхождении начальных отделов пищеварительного тракта данного вида голотурий.

Впервые установлено, что *C. schmeltzii* способна к бесполому размножению путем поперечного деления. Подробно описан процесс деления животного на два фрагмента.

Впервые для голотурий детально изучены особенности формирования внутренних структур при бесполом размножении и после поперечного разрезания. Показано, что клеточные механизмы восстановления у голотурии *C. schmeltzii* при бесполом размножении и после искусственного разрезания сходны. Регенерация большинства утраченных структур в обоих фрагментах *C. schmeltzii* происходит за счет собственного клеточного материала в результате морфаллактической перестройки сохранившихся частей соответствующих органов. Развитие передних (глотка, пищевод) и заднего (клоака) отделов пищеварительной системы *C. schmeltzii* происходит независимо от остальной части кишки. В формировании этих отделов участвуют клетки наружного эпидермиса и целомического эпителия стенки тела.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Полученные данные по ультраструктурной организации основных систем органов у голотурии *C. schmeltzii* дополняют и расширяют наши представления о строении данной группы иглокожих. Впервые описана регенерация внутренних структур при бесполом размножении и после искусственного разрезания. Полученные результаты позволяют понять тонкие механизмы восстановительных морфогенезов при различных повреждениях. Кроме того, они расширяют представления о разнообразии ультраструктурной организации внутренних органов и их функциональных нагрузок у иглокожих. В свете

полученных новых данных голотурия *C. schmeltzii* может быть использована в качестве удобной модели изучения гисто– и органогенеза при различных морфогенезах. Результаты диссертационной работы помогают глубже понять сущность феномена регенерации и развития не только у беспозвоночных, но и 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 обработке материала, самостоятельном анализе полученных данных и подготовке публикаций.

**Апробация работы.** Результаты исследований были доложены на ежегодных научных конференциях ИБМ ДВО РАН (Владивосток, 2011, 2013); Всероссийской научной конференции «Регенеративная биология и медицина» (Москва, 2011); 14-й Международной конференции по иглокожим (Brussels, 2012); Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов» (Борок, 2012); Всероссийской конференции с международным участием «Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция» (Санкт-Петербург, 2013).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 6 работ, в том числе одна статья в отечественном журнале из списка, рекомендованного ВАК, и одна – в зарубежном рецензируемом журнале.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 121 странице и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Работа содержит 174 иллюстрации (рисунков, электронограмм). Список литературы состоит из 161 наименований, из них 126 на иностранных языках.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

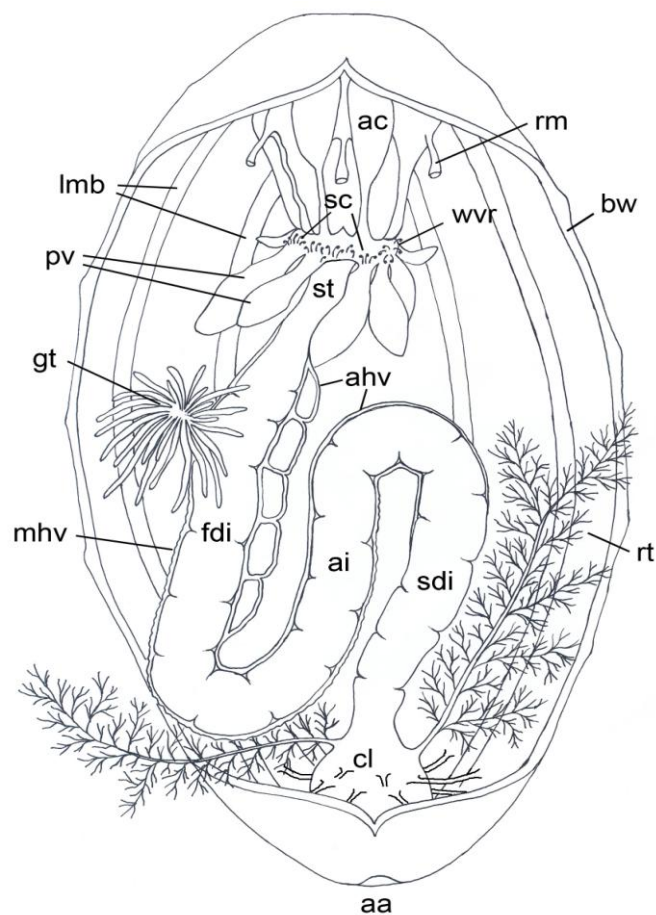
Исследования проводились на особях голотурии *Cladolabes schmeltzii* Ludwig, 1875 (Echinodermata, Holothuroidea), собранных в зал. Нячанг Южно-Китайского моря. Для изучения регенерации внутренних органов при бесполом размножении использовали найденных в природе голотурий, восстанавливающих передний или задний конец тела. Всего было проанализировано 250 особей. Для исследования регенерации после поперечного разрезания голотурий разрезали на две равные половинки и помещали в аквариум. Животных фиксировали на 5, 7, 9, 11, 14, 18, 20 и 25 сутки после нанесения повреждения. На каждый срок брали по 5 особей. Полученный материал был исследован с применением стандартных гистологических методик и методов световой микроскопии. Ультраструктуру органов и клеток изучали методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии.

### Результаты и обсуждение

#### 1. Макроанатомия

Исследование показало, что голотурия *C. schmeltzii* имеет организацию, типичную для представителей отряда Dendrochirotida. Это небольшая голотурия (максимальная длина в зал. Нячанг – 10 см), цвет покровов которой варьирует от светло-серого до почти черного. На переднем конце животного расположен рот, окруженный венчиком щупалец, а на заднем – анальное отверстие. Дорзальная сторона тела не отличается от вентральной. *C. schmeltzii* обладает обширной полостью тела, в которой располагаются внутренние органы (рис. 1). На внутренней стороне стенки тела вдоль радиусов располагаются амбулакры, состоящие из продольной мышечной ленты (ПМЛ), амбулакрального канала, гемального сосуда и нервного тяжа. У переднего конца голотурии расположен аквафарингеальный комплекс (АК), соединяющийся со стенкой тела коротким интровертом. Спереди он ограничивается околоротовым венчиком щупалец, а сзади – кольцевым амбулакральным каналом. Боковые стороны АК образованы радиальными амбулакральными и щупальцевыми каналами. Стенки их обызвествлены, в результате

чего формируется известковое окологлоточное кольцо. Пять мышц–ретракторов АК свободно лежат в целоме. Их передние концы крепятся к известковому кольцу, а задние – сливаются с ПМЛ примерно на уровне середины длины тела животного. На кольцевом амбулакральном канале располагаются 7–9 полиевых пузырей и многочисленные каменистые каналы с мадрепоритами. Число каменистых каналов у крупных особей может достигать 85–90. Большая часть кишечника свободно залегает в целомической полости и оканчивается расширенной клоакой на заднем конце тела. От клоаки спереди отходят парные водные легкие, имеющие одинаковые размеры. Единственная гонада располагается в кишечном мезентерии чуть ближе к переднему концу тела.



**Рис. 1.** Схема внутреннего строения *Cladolabes schmeltzii*. aa – анальное отверстие, ac – аквафарингеальный комплекс, ai – восходящий отдел кишечника, amv – антимезентериальный гемальный сосуд, cl – клоака, fdi – первый нисходящий отдел кишечника, gt – гонадные трубочки, bw – стенка тела, lmb – продольные мышечные ленты, mhv – мезентериальный гемальный сосуд, pv – полиевые пузыри, rm – перерезанные мускулы-ретракторы АК, rt – водные легкие, sc – каменистые каналы с мадрепоритами, sdi – второй нисходящий отдел кишечника, wvr – кольцевой амбулакральный канал.



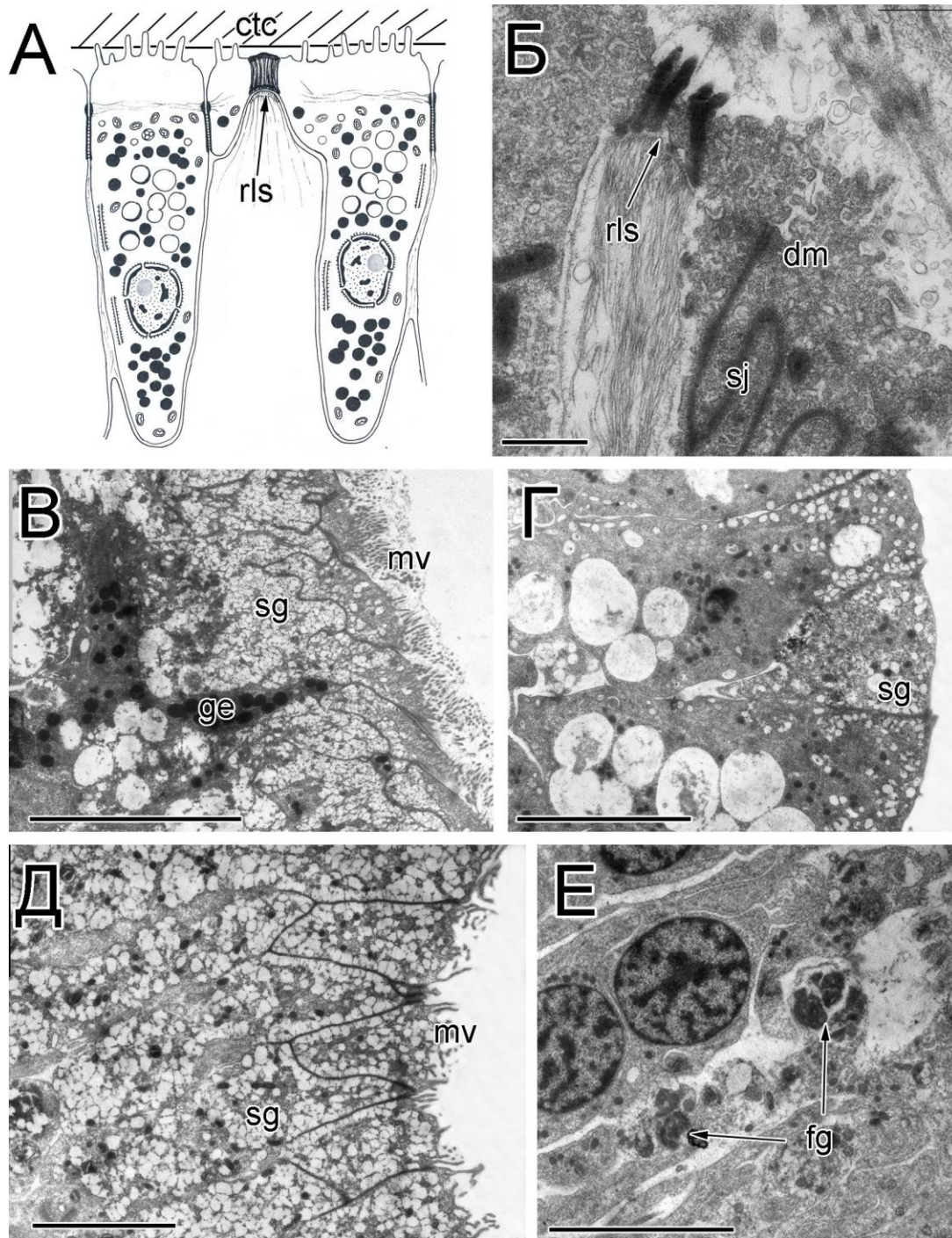
## 2. Микроанатомия внутренних органов

Согласно полученным данным, гистологическое и цитологическое строение выстилки каналов амбулакральной системы, а также ПМЛ и радиальных нервных тяжей *C. schmeltzii* типично для голотурий.

**Пищеварительный тракт** *C. schmeltzii* можно разделить на 7 отделов – глотку, пищевод, желудок, три отдела кишечника – первый нисходящий (1НО), восходящий (ВО), второй нисходящий (2НО), и клоаку. У данного вида пищеварительная система обладает рядом морфологических особенностей. Глотка и пищевод сильно укорочены и расположены внутри АК. Желудок, расположенный сразу под амбулакральным кольцом, внешне никак не выделяется на фоне остальной кишки, хотя особенности строения его стенки и позволяют идентифицировать этот отдел. Наконец, у *C. schmeltzii* отсутствует бульбус – расширенный отдел кишечника, который у других представителей Dendrochirotida расположен сразу за желудком.

Передние отделы пищеварительного тракта (глотка, пищевод, желудок) выстланы погруженным кутикулярным эпителием (рис. 2А). Апикальные части клеток связаны десмосомами и септированными контактами, а их ядродержащие области погружены в подлежащую соединительную ткань. Кроме того, в эпителии этих отделов пищеварительного тракта присутствуют специфические заклепоподобные контакты, с помощью которых эпителиоциты прикрепляются друг к другу и к внеклеточному матриксу (рис. 2А, Б). Они представляют собой систему из двух десмосом, связанных пучками внутриклеточных филаментов.

Основу выстилки кишечника составляют везикулярные энтероциты. В разных отделах кишки морфология этих клеток может несколько различаться. Везикулярные энтероциты 1НО характеризуются наличием большого числа микроворсинок, образующих щеточную кайму на апикальной поверхности эпителия (рис. 2В). В апикальной цитоплазме клеток содержится большое число секреторных пузырьков. Также в выстилке 1НО нами были обнаружены гранулярные энтероциты, цитоплазма которых содержит большое число электроплотных гранул. Можно предположить, что функцией энтероцитов этого отдела кишечника является продуцирование пищеварительных ферментов и примембранное пищеварение.



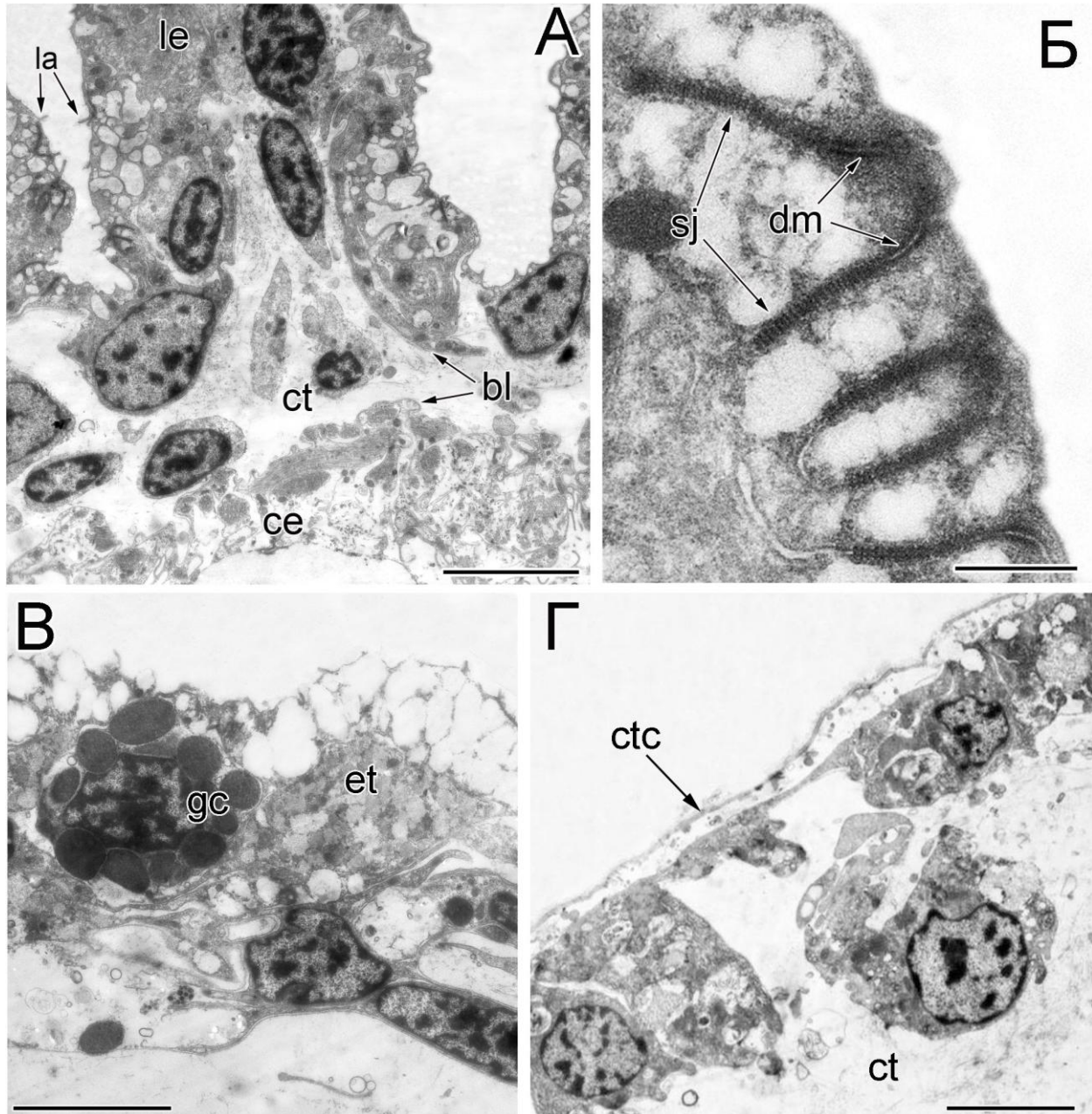
**Рис. 2.** Строение выстилки кишечника *Cladolabes schmeltzii*. А – схема строения выстилки передних отделов пищеварительного тракта; Б – Межклеточные контакты в передних отделах пищеварительного тракта; В – апикальная часть выстилки первого нисходящего отдела кишечника; Г – апикальная часть выстилки восходящего отдела кишечника; Д – апикальная часть выстилки второго нисходящего отдела кишечника; Е – фагосомы в цитоплазме энтероцитов второго нисходящего отдела кишечника. Условные обозначения: ctc – кутикула, dm – десмосома, fg – фагосомы, ge – гранулярный энтероцит, mv – микроворсинки, sg – секреторные пузырьки, sj – септированный контакт. Масштаб: Б – 1 мкм, В – Е – 5 мкм.

Во ВО на апикальной поверхности пищеварительного эпителия отсутствуют микроворсинки, сильно уменьшается количество секреторных пузырьков в апикальной цитоплазме энтероцитов, что свидетельствует о снижении их секреторной активности (рис. 2Г). В 2НО вакуолизация пищеварительного эпителия снова возрастает, кроме того, в цитоплазме везикулярных энтероцитов этой части кишки появляются многочисленные фагосомы (рис. 2Д, Е). Можно предположить, что в этом отделе кишечника наряду с секрецией происходят процессы внутриклеточного пищеварения.

Выстилка большей части клоаки образована энтероцитами по морфологии напоминающими энтероциты кишечника, и скорее всего, имеет энтодермальное происхождение (рис. 3В). Эти клетки, вероятно, выполняют функцию продуцирования слизи. Также в выстилке передней части клоаки присутствуют немногочисленные пигментные клетки, цитоплазма которых заполнена электроноплотными гранулами. Задняя часть клоаки и задний проход выстланы типичным кутикулярным эпителием, что указывает на его эктодермальное происхождение (рис. 3Г).

**Водные легкие.** Гистологическое строение водных легких *C. schmeltzii* типично для голотурий. Их стенки образованы выстилающим дыхательным эпителием и наружным целомическим эпителием, отделенных базальными мембранами от залегающего между ними слоя соединительной ткани (рис. 3А). Слой соединительной ткани, более толстый в стволе и крупных ветвях, в концевых ампулах практически сходит на нет, и эпителии отделяются друг от друга только собственными базальными мембранами. Выстилка водных легких образует складки, высота которых увеличивается в концевых веточках. Апикальные поверхности клеток дыхательного эпителия несут многочисленные ламеллы, что увеличивает поверхность газообмена. Клетки выстилки связаны между собой системой из десмосом и хорошо развитых септированных контактов, обеспечивающих барьерную функцию дыхательного эпителия (рис. 3Б).





**Рис. 3.** Строение стенки водного легкого и клоаки. А – строение стенки водного легкого; Б – межклеточные контакты в стенке водного легкого; В – выстилка передней части клоаки; Г – выстилка задней части клоаки. Условные обозначения: bl – базальная мембрана, ce – целомический эпителий, ct – соединительная ткань, ctc – кутикула, dm – десмосома, et – энтероцит клоаки, gc – пигментная клетка, la – ламеллы, le – выстилка водного легкого, sj – септированный контакт. Масштаб: А, В, Г – 5 мкм, Б – 500 нм.

### 3. Бесполое размножение

Голотурия *C. schmeltzii* способна к бесполому размножению путем поперечного деления. Место деления у данного вида располагается примерно в средней части тела, немного ближе к переднему концу (рис. 4А). Процесс начинается с формирования узкой перетяжки стенки тела, которая в течение нескольких часов становится более глубокой и широкой (рис. 4Б). В ходе деления задняя часть голотурии прикрепляется с помощью амбулакральных ножек к субстрату и остается неподвижной, в то время как передняя часть пытается ползти вперед. Это приводит к истончению и удлинению места деления (рис. 4В). Затем передний фрагмент перестает двигаться, и обе части животного сокращаются и сближаются. Голотурия остается неподвижной в течение 30–40 мин, после чего передняя ее часть снова начинает ползти вперед. После нескольких таких фаз растяжения и сокращения тело животного разделяется на две половинки (рис. 4Г). Весь процесс в искусственных условиях занимает около 24 ч.

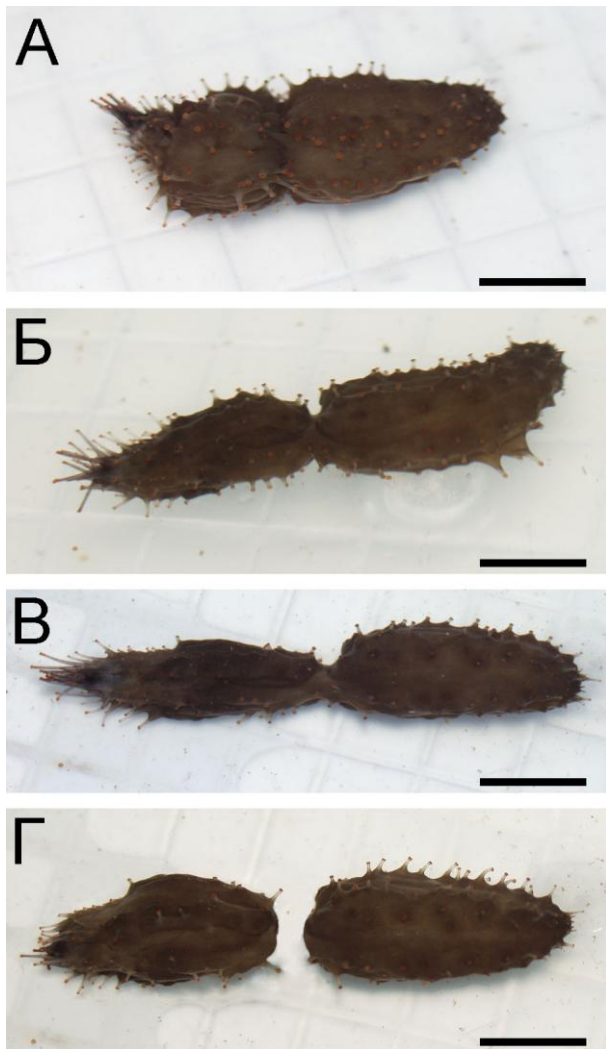
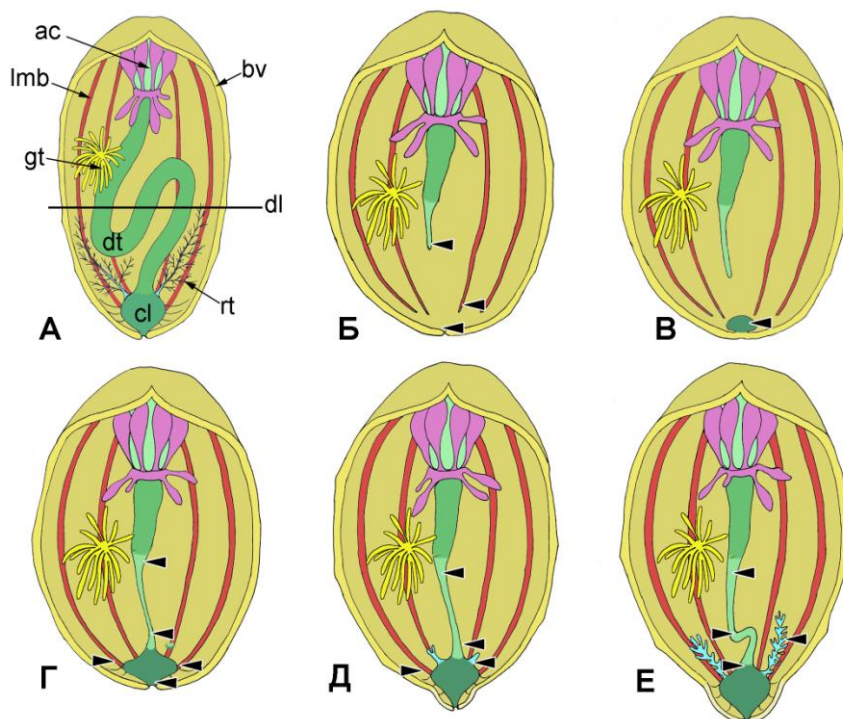


Рис. 4. Последовательные стадии (А–Г) деления *Cladolabes schmeltzii*. Масштаб: 1 см.

#### 4. Регенерация внутренних органов при бесполом размножении и после поперечного разрезания

*C. schmeltzii* может не только размножаться путем поперечного деления, но и регенерировать как передние, так и задние структуры после поперечного разрезания. Было установлено, что состав внутренних органов во фрагментах животного после бесполого размножения и искусственного разрезания практически одинаков. В задних фрагментах сохраняется большая часть кишки нормального строения и оба водных легких (рис. 5А). В передних фрагментах остается АК, от которого отходит остаток кишки, и гонада. Единственное отличие - при поперечном разрезании кишечник рассекается либо на уровне 1НО, либо на уровне желудка. В то же время, при бесполом размножении кишка всегда разрывается на уровне 1НО. Клеточные механизмы регенерации внутренних органов после поперечного разрезания и бесполого размножения также весьма сходны. Процесс формирования задних структур в переднем фрагменте был разделен на 7 стадий. Развитие передних структур в заднем фрагменте было разделено на 5 стадий.



**Рис. 5.** Схема разделения *Cladolabes schmeltzii* при бесполом размножении и поперечном разрезании (А) и последовательные стадии регенерации задних структур в передних фрагментах (Б – Е). Условные обозначения: ac – аквафарингеальный комплекс, bv – стенка тела, cl – клоака, dl – линия разделения животного, dt – пищеварительный тракт, gt – гонадные трубочки, lmb – продольные мышечные ленты. Головками стрелок показаны места проведения гистологических срезов.

#### 4.1. Регенерация задних структур

В передних фрагментах происходит формирование задних отделов кишечника, клоаки и водных легких.

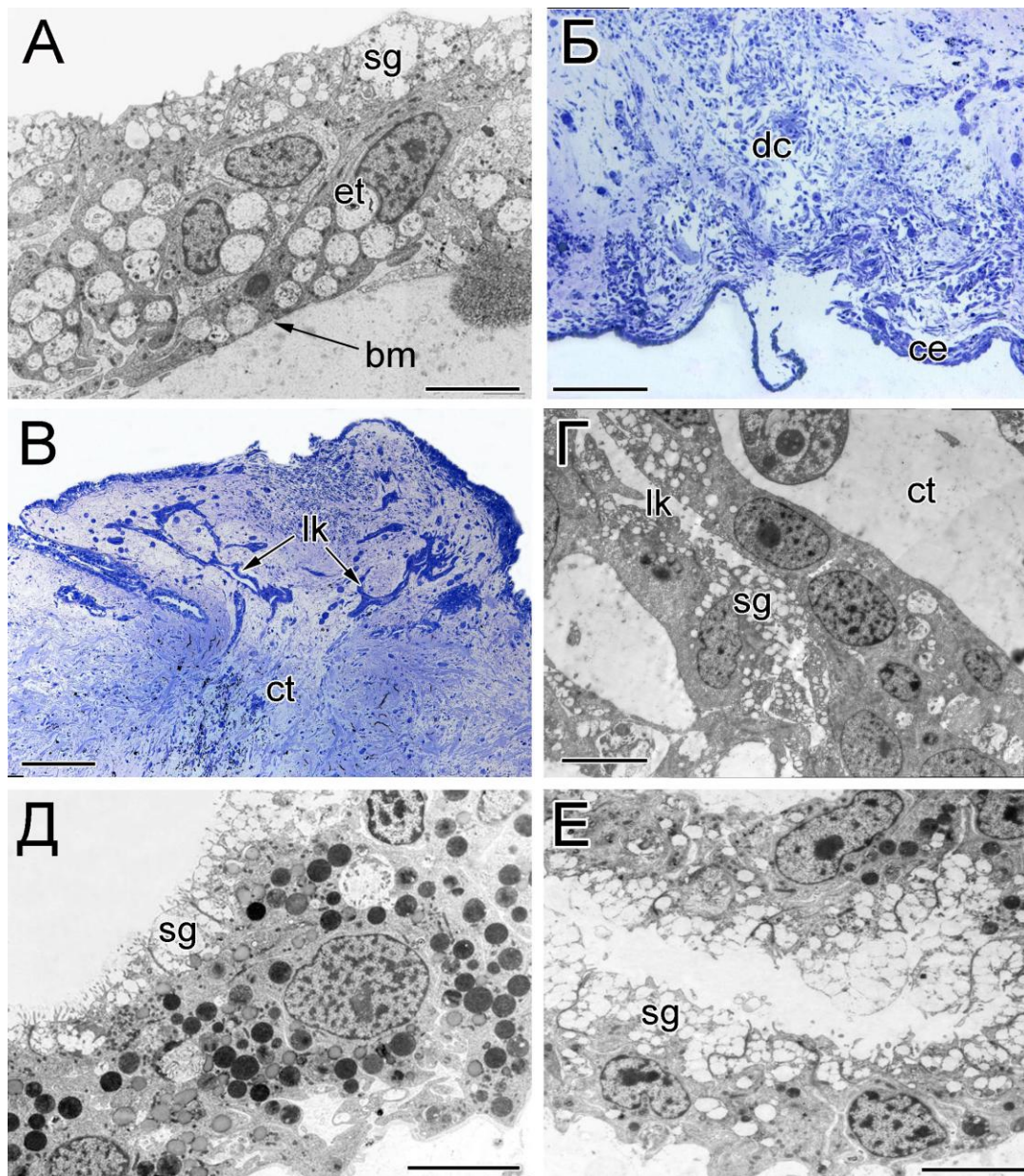
**Стадии 1–2.** В первые дни после повреждения начинается трансформация оборванного конца кишечника. От остатка кишки по мезентерию начинает отрастать зачаток, который постепенно удлиняется и растет назад (рис. 5Б). Основную роль в данном процессе играет морфаллактическая перестройка оставшейся после деления части пищеварительного тракта, в ходе которой дедифференцирующиеся клетки кишечной выстилки и целомического эпителия мигрируют вдоль подлежащей базальной мембраны (рис. 6А). На заднем конце тела в это же время идут интенсивные процессы заживления, которые сопровождаются разрушением висцеральной мускулатуры и дедифференцировкой клеток целомического эпителия, покрывающего внутреннюю стенку тела. Дедифференцированные клетки мигрируют в область повреждения, образуя скопление в соединительной ткани стенки тела (рис. 6Б).

**Стадия 3.** На третьей стадии регенерации зачаток кишки продолжает расти назад (рис. 5В). Одновременно с этим на заднем конце тела формируется зачаток клоаки в виде соединительнотканного утолщения. Внутри зачатка помимо различных целомоцитов имеются небольшие полости, выстланные однослойным эпителием (рис. 6В). Целомический эпителий, покрывающий зачаток клоаки снаружи, состоит из перитонеальных клеток, проявляющих признаки митотической активности. Выстилка полостей в соединительной ткани образована клетками неправильной формы, цитоплазма которых содержит электронопрозрачные пузырьки и вакуоли (рис. 6Г). Происхождение этих полостей остается неясным, однако можно предположить, что они образовались за счет погружения клеток наружного эпидермиса стенки тела.

**Стадии 4–5.** На четвертой–пятой стадиях регенерации растущий кишечник достигает клоаки. Одновременно с этим на заднем конце тела формируется анальное отверстие, и целостность пищеварительной системы восстанавливается (рис. 5Г). Пищеварительный эпителий кишки к этому времени уже восстанавливает свою функциональную активность, о чем свидетельствует наличие многочисленных секреторных пузырьков в апикальной цитоплазме энтероцитов (рис. 6Д).



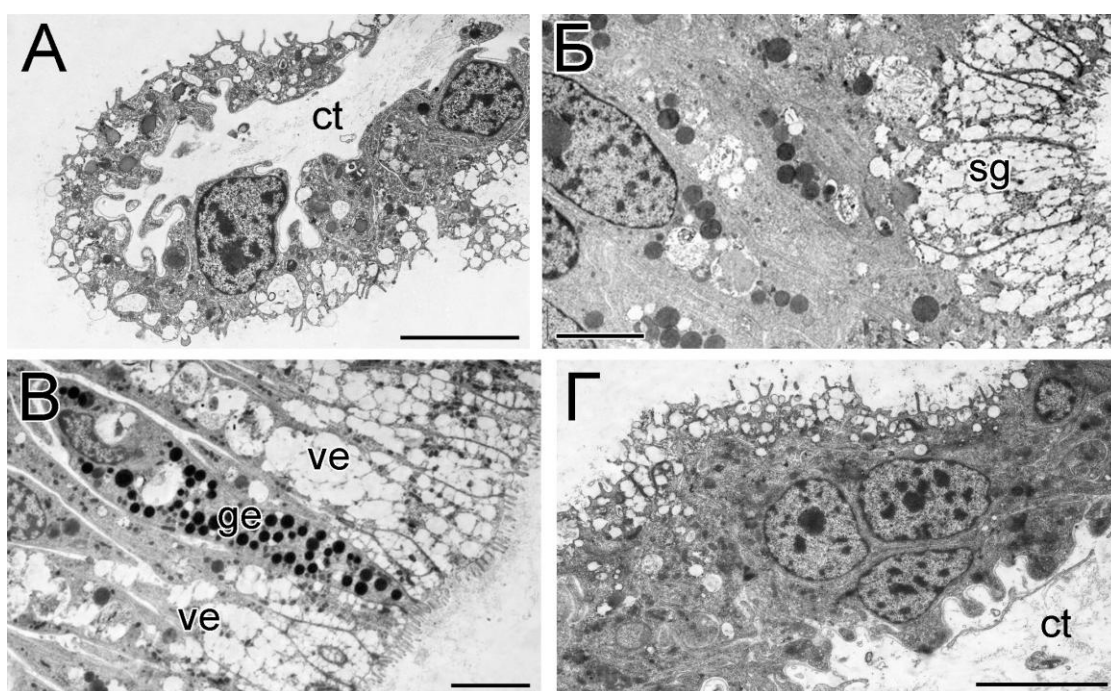
Выстилающий эпителий передней части клоаки образован клетками, по морфологии напоминающими энтероциты задней части кишки (рис. 6Е). Выстилка задней части клоаки уже на этом этапе образована кутикулярным эпителием, что подтверждает ее эктодермальное происхождение.



**Рис. 6.** Микроскопическое строение задних структур *Cladolabes schmeltzii* на 1–5 стадиях регенерации. А – пищеварительный эпителий кишки на 2 стадии регенерации; Б – процесс заживления стенки тела на 2 стадии регенерации; В – зачаток клоаки на 3 стадии регенерации; Г – полость в соединительной ткани клоаки на 3 стадии регенерации; Д – пищеварительный эпителий кишки на 5 стадии регенерации; Е – выстилка передней части клоаки на 5 стадии регенерации. Условные обозначения: bm – базальная мембрана, ce – целомический эпителий, ct – соединительная ткань стенки тела, dc – скопление дедифференцированных клеток, et – энтероцит выстилки кишки, lk – просвет полости в соединительной ткани, sg – секреторные пузырьки. Масштаб: А, Г – Е – 5 мкм, Б, В – 100 мкм.



**Стадия 6.** На шестой стадии регенерации начинается формирование водных легких (рис. 5Д). Они образуются в виде выростов передней стенки клоаки и постепенно растут вперед, увеличиваясь в размерах и образуя боковые веточки. Дыхательный эпителий водных легких является продуктом трансформации клеток выстилки клоаки. Даже при небольших размерах этих органов, он уже обладает всеми признаками, характерными для выстилки водных легких в норме (рис. 7А). Высота пищеварительного эпителия постепенно увеличивается. Синтетическая активность энтероцитов кишечной выстилки растет (рис. 7Б). На этой стадии регенерации появляются первые наружные признаки восстановления. На заднем конце тела животного образуется вырост, который составляет 2–3% общей длины тела.



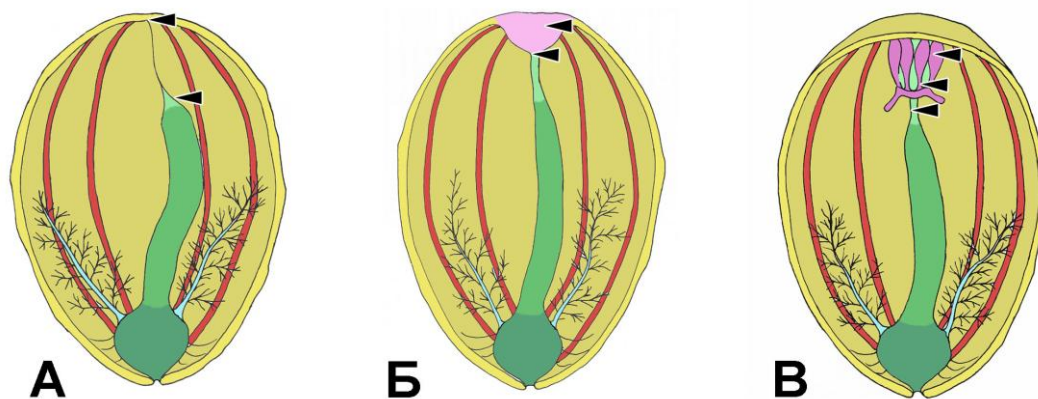
**Рис. 7.** Строение задних структур *C. schmeltzii* на 6–7 стадиях регенерации. А – выстилка водного легкого на 6 стадии регенерации; Б – пищеварительный эпителий кишки на 6 стадии регенерации; В – пищеварительный эпителий кишки на 7 стадии регенерации; Г – выстилка водного легкого на 7 стадии регенерации. Условные обозначения: ct – соединительная ткань, ge – гранулярный энтероцит, sg – секреторные гранулы, ve – везикулярный энтероцит. Масштаб: 5 мкм.

**Стадия 7.** На седьмой стадии регенерации животное уже имеет хорошо развитые водные легкие с большим количеством боковых веточек (рис. 5Е). Начинается формирование восходящей петли кишечника. Пищеварительный эпителий на данной стадии уже имеет строение, близкое к нормальному. В нем начинается разделение клеточных типов на везикулярные и гранулярные энтероциты (рис. 7В). Толщина выстилки водных легких несколько увеличивается (рис. 7Г).

Вырост заднего конца тела к этому времени достигает 6–9% от общей длины животного.

#### 4.1. Регенерация передних структур

В задних фрагментах происходит формирование АК и передних отделов пищеварительного тракта.

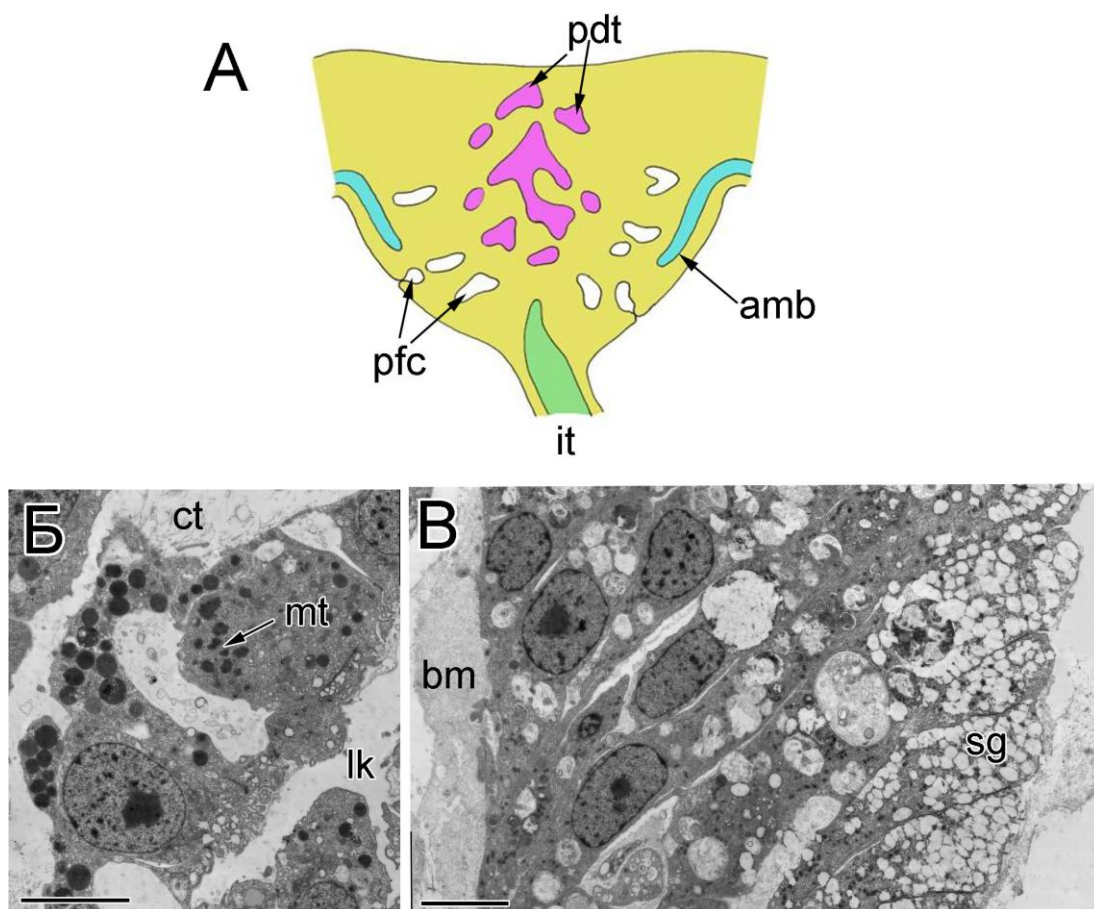


**Рис. 8.** Последовательные стадии (А – В) регенерации передних структур *C. schmeltzii*. Головками стрелок показаны места проведения гистологических срезов.

**Стадия 1.** На первой стадии регенерации происходит перестройка передней части остатка пищеварительного тракта, и заживление раны на переднем конце тела животного (рис. 8А). Механизмы этих процессов аналогичны таковым, имеющим место при регенерации задних структур.

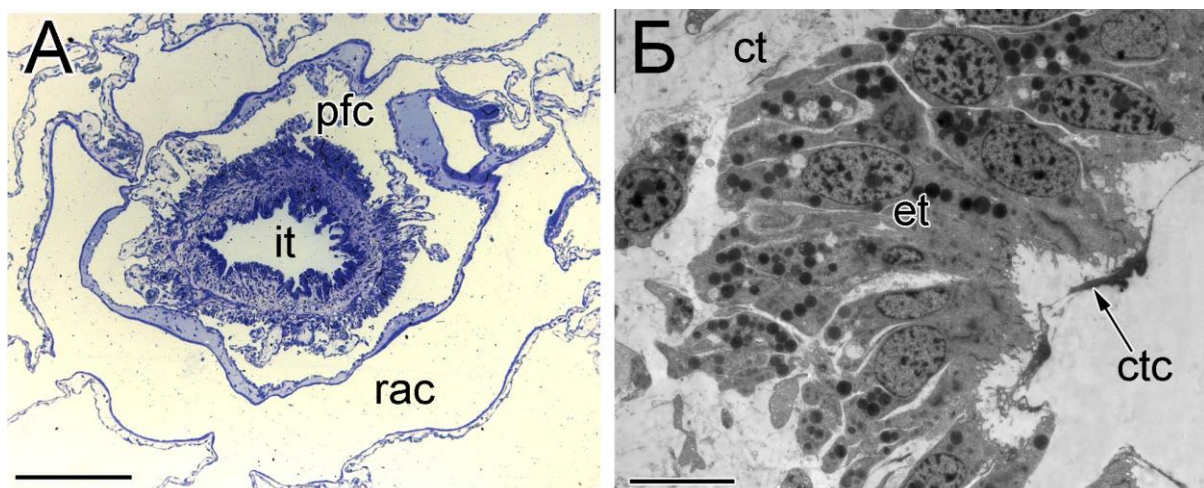
**Стадия 2.** На второй стадии регенерации начинается формирование АК. Он образуется в виде соединительнотканного утолщения в месте схождения амбулакров (рис. 8Б). Радиальные амбулакральные каналы и радиальные нервные тяжи вырастают в основание АК (рис. 9А). Кишка в это же время удлиняется вперед по мезентерию и вырастает в его заднюю часть. Группы клеток целомического эпителия погружаются в подлежащую соединительную ткань, образуя в ее толще множество мелких полостей, из которых потом сформируется перифарингеальный целом. Полости, располагающиеся ближе к центральной части АК, значительно крупнее, они представляют зачаток передних отделов пищеварительной системы голотурии. Их выстилка образована клетками неправильной формы, проявляющими признаки

митотической активности (рис. 9Б). Цитоплазма клеток содержит гранулы высокой электронной плотности, а также большое число апикально расположенных секреторных пузырьков и электронопрозрачных вакуолей. Происхождение этих клеток остается неясным. Возможно, что как и при регенерации клоаки, их источником является наружный эпидермис стенки тела. Выстилка концевой отдела кишечника, врастающего в заднюю часть АК, формируется за счет морфаллактической перестройки оставшейся части органа. Она образована дедифференцированными везикулярными энтероцитами, которые не проявляют признаков митотической активности и мигрируют единым пластом вдоль подлежащей базальной мембраны (рис. 9В).



**Рис. 9.** Строение аквафарингеального комплекса *Cladolabes schmeltzii* на 2 стадии регенерации. А – схема строения зачатка АК, вид сбоку; Б – выстилка полости в соединительной ткани АК; В – пищеварительный эпителий энтодермального зачатка кишечника. Условные обозначения: amb – радиальный амбулакральный канал, bm – базальная мембрана, ct – кутикула, it – энтодермальный зачаток кишки, lk – просвет полости в соединительной ткани АК, mt – митоз, pdt – зачаток передних отделов пищеварительного тракта, pfc – зачаток перифарингеального целома, sg – секреторные пузырьки. Масштаб: Б, В – 5 мкм.

**Стадия 3–4.** На третьей – четвертой стадиях регенерации полость энтодермального зачатка кишки сливается с формирующимися внутри АК передними отделами пищеварительного тракта. При этом если кишечная трубка была разделена на уровне первого нисходящего отдела, то в процессе дифференцировки расположенных внутри АК эктодермальных отделов пищеварительного тракта формирование желудка происходит за счет постепенного «вытеснения» энтодермальной кишечной выстилки. При разрыве кишечника на уровне желудка соотношение передних отделов пищеварительного тракта остается неизменным. Микрополости, образованные целомическим эпителием, сливаются вместе, формируя полость перифарингеального целома вокруг передних отделов кишки (рис. 10А). Кроме того, на этой стадии завершается развитие основных элементов органов амбулакальной и нервной систем, входящих в состав АК. Радиальные амбулакральные каналы растут назад и формируют на заднем конце АК амбулакральное кольцевое сосуд, а радиальные нервы образуют нервное кольцо у его переднего края. На данном этапе начинается дифференцировка выстилки передней части пищеварительного тракта, расположенной внутри АК. Основу ее составляют молодые энтероциты, цитоплазма которых содержит большое число электроноплотных гранул (рис. 10Б). Клетки уже начинают выделять на своей апикальной поверхности тонкую кутикулу.



**Рис. 10.** Строение аквафарингеального комплекса *Cladolabes schmeltzii* на 3–4 стадии регенерации. А – поперечный срез через амбулакральное кольцо. Б – пищеварительный эпителий передних отделов пищеварительного тракта. Условные обозначения: ct – соединительная ткань, ctc – кутикула, et – молодой энтероцит, it – просвет кишечника, pfc – перифарингеальный целом, rac – амбулакральное кольцо. Масштаб: А – 100 мкм, Б – 5 мкм.



**Стадия 5.** На последней стадии регенерации все основные элементы АК полностью сформированы (рис. 8В). В его боковых стенках увеличивается количество соединительной ткани, что свидетельствует о начале процессов кальцификации и формирования окологлоточного известкового кольца.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые изучено строение внутренних структур голотурии *Cladolabes schmeltzii* в норме. Показано, что тонкое строение амбулакальной, нервной, мышечной и дыхательной систем этого животного типично для представителей класса Holothuroidea. Передние отделы пищеварительного тракта (глотка, пищевод и желудок) выстланы погруженным кутикулярным эпителием, который образован клетками Т-образной формы. Наличие в этом эпителии специфических заклепочных контактов позволяет предположить эктодермальное происхождение передних отделов пищеварительного тракта *C. schmeltzii*. Основу выстилки кишечника *C. schmeltzii* составляют везикулярные энтероциты, морфология которых может несколько различаться в разных отделах кишки.

Впервые установлено, что голотурия *C. schmeltzii* способна к бесполому размножению путем поперечного деления. Место деления располагается примерно в средней части тела, немного ближе к переднему концу. Весь процесс в искусственных условиях занимает примерно 24 часа.

Впервые показана способность *C. schmeltzii* регенерировать как передние, так и задние структуры после поперечного разрезания. Установлено, что состав внутренних органов во фрагментах животного, а также клеточные механизмы формирования утраченных структур после бесполого размножения и поперечного разрезания, сходны между собой. Регенерация большинства внутренних органов в обоих фрагментах *C. schmeltzii* происходит за счет собственного клеточного материала в результате морфаллактической перестройки оставшейся части органов. Развитие передних (глотка, пищевод) и заднего (клоака) отделов пищеварительной системы *C. schmeltzii* происходит независимо от остальной части кишки. В формировании этих органов участвуют клетки наружного эпидермиса и целомического эпителия стенки тела.

## ВЫВОДЫ

1. Амбулакральная, нервная, мышечная и дыхательная системы *Cladolabes schmeltzii* имеют типичную для голотурий макро- и микроанатомическую организацию.

2. Выстилка глотки, пищевода, желудка и задней части клоаки *C. schmeltzii* образована кутикулярным эпителием. Эпителиоциты глотки, пищевода и желудка соединяются друг с другом и с подлежащим внеклеточным матриксом с помощью септированных и заклепочных (rivet-like) контактов. Наличие последних подтверждает эктодермальное происхождение начальных отделов пищеварительного тракта данного вида голотурий.

3. Кишечник *C. schmeltzii* подразделяется на 3 отдела – первый нисходящий, восходящий и второй нисходящий. Основу выстилки составляют везикулярные энтероциты, которые характеризуются наличием в цитоплазме крупных и мелких секреторных вакуолей. Количество секреторных вакуолей и степень развития микроворсинок на апикальной поверхности энтероцитов варьирует в разных отделах кишечника. В первом нисходящем отделе кишечника имеются также гранулярные энтероциты, содержащие в цитоплазме электроноплотные гранулы диаметром 0,4–0,7 мкм.

4. Голотурия *C. schmeltzii* обладает способностью к бесполому размножению путем поперечного деления. Это первый для северной части Индо-Пацифики представитель отряда Dendrochirotida, способный к поперечному делению. Кроме того, это пока единственный вид из семейства Sclerodactilidae, обладающий бесполом размножением.

5. Голотурия *C. schmeltzii* способна к полной регенерации как передних, так и задних структур после поперечного разрезания. Данный процесс занимает около 30 суток.

6. Клеточные механизмы восстановления внутренних органов у голотурии *C. schmeltzii* при бесполом размножении и после искусственного разрезания сходны между собой. Различия определяются местом разрыва пищеварительного тракта. При искусственном разрезании оно может варьировать в зависимости от положения

кишечника в полости тела животного. При бесполом размножении пищеварительный тракт всегда разрывается на уровне первого нисходящего отдела кишечника.

7. Регенерация большинства утраченных структур в обоих фрагментах *S. schmeltzii* как при бесполом размножении, так и после искусственного разрезания происходит за счет собственного клеточного материала в результате морфоллактической перестройки оставшейся части органа.

8. Развитие передних (глотка, пищевод) и заднего (клоака) отделов пищеварительной системы происходит независимо от остальной части кишки. В формировании этих органов участвуют клетки наружного эпидермиса и целомического эпителия стенки тела.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. Долматов И.Ю., Нгуен Ан Хан, **Каменев Я.О.** Особенности бесполого размножения, эвисцерации и регенерации у голотурий (Holothuroidea) из залива Нячанг Южно-Китайского моря // Биология моря. 2012. Т. 38, № 3. С. 227–236.
2. **Kamenev Y.O.**, Dolmatov I.Y., Frolova L.T., Khang N.A. The morphology of the digestive tract and respiratory organs of the holothurian *Cladolabes schmeltzii* (Holothuroidea, Dendrochirotida) // Tissue and Cell. 2013. Vol. 45. P. 126–139.

### Публикации в материалах конференций:

3. Долматов И.Ю., **Каменев Я.О.** Регенерация у голотурий *Cladolabes schmeltzii* и *Colochirus robustus* // Сборник научных трудов Всероссийской конференции «Региональная биология и медицина». М.: Изд. Дом «Нарконет», 2011. С. 61–62.
4. **Каменев Я.О.**, Долматов И.Ю. Особенности бесполого размножения у голотурии *Cladolabes schmeltzii* // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов». Борок, 2012. 167–169.
5. **Kamenev Ya.O.**, Dolmatov I.Yu. Asexual reproduction of the holothurian *Cladolabes schmeltzii* (Holothuroidea, Echinodermata) // 14<sup>th</sup> International Echinoderm Conference: Brussels. 2012. Conference booklet. Brussels, 2012. P. 110.
6. **Каменев Я.О.**, Долматов И.Ю. Регенерация и бесполое размножение у голотурии *Cladolabes schmeltzii* // Эмбриональное развитие морфогенез и эволюция. Всероссийская конференция с международным участием. Санкт-Петербург. Изд-во ВВМ. 2013. С. 129–130.



**Каменев Ярослав Олегович**

**УЛЬТРАСТРУКТУРА ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ, БЕСПОЛОЕ  
РАЗМНОЖЕНИЕ И РЕГЕНЕРАЦИЯ У ГОЛОТУРИИ  
*CLADOLABES SCHMELTZII***

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Подписано в печать 15.11.2013. Формат 60×84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>  
Усл. печ. л. 1,45 Уч.-изд. л. 1,35  
Тираж 70 экз. Заказ 634.  
Отпечатано в Дирекции публикационной деятельности ДВФУ  
690990, г. Владивосток, ул. Пушкинская, 10