

На правах рукописи

АХМАДИЕВА

Анна Владимировна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ С РЕПРОДУКТИВНОЙ
СТРАТЕГИЕЙ, ВКЛЮЧАЮЩЕЙ БЕСПОЛОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ**

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Владивосток – 2008

**Работа выполнена в Институте биологии моря имени А. В. Жирмунского
ДВО РАН**

Научный руководитель: *Доктор биологических наук, профессор
Валерия Васильевна Исаева*

Официальные оппоненты: *Доктор биологических наук
Владимир Владимирович Юшин
Кандидат биологических наук, доцент
Наталья Павловна Токмакова*

Ведущая организация: *Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН*

Защита состоится “____” февраля 2008 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Институте биологии моря имени А. В. Жирмунского ДВО РАН по адресу: 690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17. Телефон: (4232) 310-905; факс: (4232) 310-900; e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря ДВО РАН (690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17).

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

Автореферат разослан “___” января 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Эмбриональные стволовые клетки человека широко исследуются ввиду перспектив их практического применения для клеточной терапии; такие исследования составляют основу новых биомедицинских технологий. Для понимания клеточных, субклеточных и молекулярных механизмов, определяющих особенности морфофункциональной организации тотипотентных стволовых клеток, дающих начало всем клеточным линиям и всему спектру дифференцировок клеток Metazoa, необходимо их сравнительное исследование у различных представителей многоклеточных животных. Однако стволовые клетки беспозвоночных животных, как правило, значительно менее изучены сравнительно с эмбриональными стволовыми клетками млекопитающих. У беспозвоночных с бесполом размножением линия тотипотентных стволовых клеток поддерживается в течение всей жизни организма: это археоциты губок, интерстициальные клетки кишечноротовых, необласты турбеллярий и стволовые клетки колониальных асцидий (Agata, Watanabe, 1999; Shibata et al., 1999; Weissman, 2000; Gschwenter et al., 2001; Peter et al., 2001 и др.). Стволовые клетки колониальных беспозвоночных других таксонов почти не изучены; стволовые же клетки корнеголовых ракообразных, некоторые представители которых имеют колониальную стадию жизненного цикла, впервые обнаружены нами (Isaeva et al., 2001).

Множество молекулярно-биологических данных свидетельствует о том, что поддержание организации и функциональной активности зародышевой плазмы обеспечивается консервативными механизмами, общими для всех исследованных Metazoa от губок, гидроидов и планарий до млекопитающих (Ikenishi, 1998; Shibata, 1999; Wylie, 1999; Metazoa, Cooley, 2000; Seydoux, Braun, 2006, Strome, Lehman, 2007). Основываясь на литературных и

собственных данных, мы предполагаем подобную консервативность ультраструктурной организации стволовых клеток.

Стволовые клетки исследованных нами колониальных беспозвоночных обладают морфологическими характеристиками, общими для стволовых, эмбриональных, первичных половых и гониальных клеток всех Metazoa: крупным светлым ядром с деконденсированным хроматином, крупным ядрышком, компактной базофильной цитоплазмой, детерминантами зародышевой плазмы характерной ультраструктурной морфологии (Isaeva et al., 2001; Ахмадиева и др., 2007; Исаева и др., 2007).

Работа направлена на решение проблемы общности и консерватизма морфофункциональной организации тотипотентных стволовых клеток Metazoa путем изучения беспозвоночных животных с бесполом размножением и постоянной самоподдерживающейся линией стволовых клеток, способных продуцировать как половые, так и соматические клетки. Молекулярно-биологические данные других авторов свидетельствуют о древних консервативных механизмах функциональной организации детерминантов линии половых клеток Metazoa. Герминальные (половые, или зародышевые) детерминанты исследовались в качестве ультраструктурного маркера тотипотентных стволовых клеток беспозвоночных животных. Цитохимическим маркером стволовых клеток была избрана цитохимическая реакция выявления активности щелочной фосфатазы, ранее широко использованная для идентификации эмбриональных стволовых клеток и первичных половых клеток млекопитающих (Chiquoine, 1954; Mintz, 1959; Talbot et al., 1993; Thomson et al., 1995, 1998 и др.). На беспозвоночных животных подобные исследования впервые проведены нами. В качестве молекулярного маркера тотипотентных стволовых клеток планарий, гидры и колониальных корнеголовых (Shibata et al., 1999; Mochizuki et al., 2001; Shukalyuk et al., 2007) применено выявление специфической избирательной экспрессии продукта гена *vasa* методом гибридизации *in situ*.

Цель работы – исследовать структурную и функциональную организацию стволовых клеток представителей пяти типов многоклеточных животных: Porifera, Cnidaria, Platyhelminthes, Arthropoda и Chordata в связи с теоретической и практической важностью изучения эмбриональных стволовых клеток, а также проблемами обособления линий половых и соматических клеток, бесполого размножения, колониальности, стратегии размножения и развития Metazoa.

Для достижения цели исследования поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить ультраструктурные особенности стволовых клеток губки *Oscarella malakhovi* (Porifera).
2. Изучить ультраструктурные, цитохимические и иммунохимические особенности стволовых клеток гидроидного полипа *Obelia longissima* (Cnidaria).
3. Изучить ультраструктурные особенности стволовых и гониальных клеток планарии *Girardia (Dugesia) tigrina* (Platyhelminthes).
4. Изучить ультраструктурные, цитохимические и иммунохимические особенности стволовых и эмбриональных клеток корнеголовых ракообразных *Peltogasterella gracilis* и *Polyascus polygenea* (Arthropoda).
5. Изучить ультраструктурные и цитохимические особенности стволовых клеток асцидии *Botryllus tuberatus* (Chordata).
6. Провести сравнительный морфофункциональный анализ стволовых клеток исследованных представителей Metazoa.

Научная новизна

Сведения о стволовых клетках большинства колониальных беспозвоночных неполны, а для некоторых таксонов до сих пор отсутствуют. Мы впервые начали проводить на беспозвоночных животных исследования с выявлением активности щелочной фосфатазы как маркера тотипотентных (или плюрипотентных) стволовых клеток.

Исследованы стволовые клетки (архециты) у беспикульной губки *Oscarella malakhovi*. В цитоплазме архецитов впервые обнаружены герминальные гранулы.

В больших интерстициальных клетках колониального гидроида *Obelia longissima* найдены герминальные гранулы (именуемые исследователями других видов гидроидов плотными телами). Выявлено специфическое окрашивание интерстициальных клеток при цитохимической реакции на щелочную фосфатазу; найдена позитивная реакция больших интерстициальных клеток при иммунохимической реакции выявления ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA).

В необластах (стволовых клетках) и гониальных клетках планарии *Girardia tigrina* найдены герминальные гранулы типичной морфологии (именуемые у планарий хроматоидными телами).

Стволовые клетки колониальных корнеголовых ракообразных впервые обнаружены и исследованы нами. Показано, что при почковании столонов интерны стволовые клетки дают начало зачаткам бластозооидов, а затем мигрируют в зачаток яичника, становясь гониальными клетками. В стволовых клетках *Peltogasterella gracilis* найдены герминальные гранулы типичной морфологии. В герминальных гранулах дробящихся эмбрионов *Polyascus polygenea* обнаружена специфическая избирательная экспрессия продукта гена *vasa* – маркера клеток половой линии Metazoa и тотипотентных стволовых клеток беспозвоночных, размножающихся бесполом путем. Стволовые клетки *Peltogasterella gracilis* – единственный тип клеток, проявляющих интенсивную позитивную реакцию при выявлении ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA).

В ранних почках и сосудистой системе колонии *Botryllus tuberatus* впервые обнаружены недифференцированные клетки, обладающие морфологическими признаками стволовых и первичных половых клеток многоклеточных животных. Стволовые клетки содержат мелкие герминальные гранулы, сходные с материалом piage позвоночных животных.

В развивающихся почках и некоторых клетках популяции гемоцитов выявлена интенсивная экспрессия активности щелочной фосфатазы, цитохимического маркера эмбриональных стволовых и первичных половых клеток позвоночных животных.

Таким образом, в результате проведенного анализа выявлены общие ультраструктурные, а также некоторые цитохимические и молекулярные особенности строения стволовых клеток у исследованных представителей типов Porifera, Cnidaria, Platyhelminthes, Arthropoda и Chordata.

Теоретическое и практическое значение

Показано, что у беспозвоночных животных с бесполом размножением тотипотентные (по меньшей мере, плюрипотентные) клетки – источник клеточного материала для реализации жизненной стратегии, включающей и половое, и бесполое размножение; эти клетки способны дифференцироваться в половые и соматические клетки. Эти клетки обладают эволюционно консервативными чертами морфофункциональной организации, объединяющими их с тотипотентными клетками раннего зародыша и клетками половой линии. Результаты работы могут быть использованы в практике преподавания клеточной биологии и биологии развития студентам-биологам.

Апробация работы

Материалы исследований докладывались на конференции ИБМ ДВО РАН (2007 г.), на научных семинарах лаборатории продукционной биологии ИБМ ДВО РАН (2005, 2006, 2007 гг.), были представлены в виде стендового сообщения на конференции по клеточной биологии в Сан-Франциско (The American Society for Cell Biology, 45th Annual Meeting, 2005).

Публикации

По теме диссертации опубликованы 5 статей, в том числе 4 статьи в журналах из списка, рекомендуемого ВАК, 2 тезисов; 1 статья принята к печати.

Структура работы

Диссертация содержит 117 страниц, включает 75 рисунков и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материал и методы, собственные данные, обсуждение, заключение, выводы и список литературы, включающий 151 наименование, из них 136 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Биологические и биомедицинские исследования стволовых клеток млекопитающих активно проводятся в связи с перспективами клеточной терапии, однако ключевые субклеточные и молекулярные механизмы тотипотентности и потенциального бессмертия стволовых клеток до сих пор недостаточно изучены. Для понимания этих фундаментальных механизмов необходимо сравнительное исследование стволовых и половых клеток различных представителей многоклеточных животных. Согласно общепринятым представлениям, стволовые клетки – это клетки эмбрионов или взрослых организмов, способные репродуцировать себя в течение длительного периода, а в случае взрослых организмов – на протяжении всей жизни организма; эта способность стволовых клеток называется самообновлением. Тотипотентные клетки могут дать начало всем клеточным типам развивающегося организма. Плюрипотентные (мультипотентные) стволовые клетки способны дать многие типы клеток (Marshak et al., 2001; Winslow, 2001).

Репродуктивная стратегия многоклеточных животных может включать как половое, так и бесполое размножение. У размножающихся лишь половым путем организмов в раннем эмбриогенезе отделяется линия первичных половых клеток, сохраняющих тотипотентность и дающих начало гаметам, а после слияния яйцеклетки и спермия – тотипотентной зиготе, способной к развитию всех типов клеток организма следующего поколения (Wylie, 1999; Raz, 2000). Клетки половой линии могут быть

идентифицированы и прослежены в ходе развития организма благодаря присутствию специализированной области цитоплазмы, называемой герминальной (половой, зародышевой) плазмой, включающей митохондрии и специфические ультраструктурные маркеры – герминальные (половые) детерминанты. Половые детерминанты представлены гранулярным или фибриллярным материалом, именуемым у различных животных полярными, или герминальными гранулами (телами), хроматоидными, перинуклеарными или плотными телами, нуаж (nuage) и т. д. (Mahowald, 1971, 2001; Beams, Kessel, 1974; Eddy, 1975; Айзенштадт, 1984; Ikenishi, 1998; Saffman, Lasko, 1999; Houston, King, 2000; Исаева, Реунов, 2001; Matova, Cooley, 2001; Seydoux, Braun, 2006).

Показано, что локализованные в половых детерминантах молекулы вовлечены в детерминацию клеток половой линии, а кодирующие их гены эволюционно консервативны у различных исследованных представителей Metazoa – от губок и гидроидов до млекопитающих (Ikenishi, 1998; Saffman, Lasko, 1999; Houston, King, 2000; Matova, Cooley, 2001; Seydoux, Braun, 2006). В частности, в составе герминальных гранул представителей нематод, планарий, насекомых и позвоночных найден белковый продукт (РНК-хеликаза) гена *vasa* или его гомологов – один из ключевых детерминантов линии половых клеток (Ding, Lipshitz, 1993; Ikenishi, 1998; Saffman, Lasko, 1999; Shibata et al., 1999; Houston, King, 2000; Matova, Cooley, 2001; Mochizuki et al., 2001; Seydoux, Braun, 2006). Таким образом, особенности структурной организации цитоплазмы и функциональной активности клеток половой линии обеспечиваются эволюционно консервативными механизмами, общими для всех исследованных многоклеточных животных.

У беспозвоночных животных с чередованием полового и бесполого размножения не происходит раннего выделения линии половых клеток (Buss, 1999), тогда как линия тотипотентных (по крайней мере мультипотентных) стволовых клеток, способных к дифференциации во все типы (или широкий спектр) клеток организма, включая клетки половой линии, поддерживается

митотическим делением в течение всей жизни индивида или колонии. Примерами таких стволовых клеток являются архециты губок, интерстициальные клетки книдарий, необласты турбеллярий и стволовые клетки колониальных асцидий и корнеголовых ракообразных (Bode, 1996; Agata, Watanabe, 1999; Shibata et al., 1999; Weissman, 2000; Gschwentner et al., 2001; Peter et al., 2001; Shukalyuk et al., 2005, 2007). Морфофункциональные характеристики такого рода стволовых клеток оказываются общими для эмбриональных стволовых клеток и клеток половой линии всех исследованных многоклеточных животных: высокое ядерно-цитоплазматическое отношение, крупное ядро с диффузным хроматином и большим ядрышком, базофильная цитоплазма, включающая специфические структурированные герминальные гранулы, содержащие набор специфических регуляторных молекул. Тотипотентные стволовые клетки обеспечивают бесполое и половое размножение, оказываясь предшественниками и половых, и соматических клеток, что наиболее убедительно продемонстрировано на планариях (Baguña et al., 1989; Shibata et al., 1999; Peter et al., 2001). Сведения о стволовых клетках большинства колониальных беспозвоночных неполны, а для некоторых таксонов отсутствуют.

Электронно-плотные тела, подобные или идентичные герминальным гранулам клеток половой линии, обнаружены в тотипотентных стволовых клетках (необластах) планарий (Shibata et al., 1999; Isaeva et al., 2005), больших интерстициальных клетках гидры *Pelmatohydra robusta* (Noda, Kanai, 1977; Mochizuki et al., 2001) и стволовых клетках колониальных корнеголовых ракообразных (Shukalyuk et al., 2005). У планарий (Shibata et al., 1999), гидры (Mochizuki et al., 2001) и колониального корнеголового ракообразного *Polyascus polygenea* (Shukalyuk et al., 2007) показано присутствие продукта гомолога гена *vasa*, вовлеченного в детерминацию тотипотентности клеток, не только в клетках половой линии, но и в тотипотентных стволовых клетках.

Материал и методы

Сбор материала

Oscarella malakhovi

Губка *Oscarella malakhovi* Ereskovsky, 2006 была собрана в районе Морской биологической станции (МБС) «Восток» Института биологии моря имени А. В. Жирмунского ДВО РАН (на «Бакланьих камнях») с глубины 0,35-0,55 м в августе 2006 г. и июле 2007 г.

Obelia longissima

Гидроидный полип *Obelia longissima* Pallas, 1766 был собран на побережье Уссурийского залива (зал. Петра Великого Японского моря) в районе бухты Тихой, в феврале-марте 2005 г., когда происходит почкование колоний и образование новых зооидов.

Girardia (Dugesia) tigrina

Для исследования были использованы планарии *Girardia (Dugesia) tigrina* De Vries, Sluys, 1991 бесполой расы, культивируемые в лабораторных условиях при комнатной температуре в стеклянной посуде. Кормом для планарий служили трубочник и мотыль.

Peltogasterella gracilis, Polyascus polygenea, Peltogaster reticulatus

Корнеголовые ракообразные *Peltogasterella gracilis*, Krüger, 1912, паразит раков-отшельников *Pagurus pectinatus* и *Pagurus ochotensis*, *Polyascus polygenea* Glenner, Lützen, Takahashi, 2003, паразитирующая на прибрежном крабе *Hemigrapsus sanguineus*, и *Peltogaster reticulatus* Shiino, паразит рака-отшельника *Pagurus proximus*, были собраны в осенне-летний период 1998-2007 гг. в районе Морской биологической станции (МБС) «Восток» Института биологии моря имени А. В. Жирмунского ДВО РАН на глубинах от 0,1-0,5 м до 1,5-5 м.

Botryllus tuberatus

Колонии асцидии *Botryllus tuberatus* Ritter et Forsyth, 1917 были собраны в районе Морской биологической станции «Восток» (МБС) Института биологии моря имени А. В. Жирмунского ДВО РАН (на «Бакланьих камнях») с глубины 0,35-0,55 м в сентябре 2005 г. и в августе 2006 г.

Гистологические исследования

Для гистологического исследования участки колоний *Obelia longissima*, *Botryllus tuberatus* и *Oscarella malakhovi* фиксировали жидкостью Буэна, образцы обрабатывали по стандартным гистологическим методикам, обезвоживали, заливали в парафин; серийные срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином Караччи и заключали в канадский бальзам.

Трансмиссионная электронная микроскопия

Для электронно-микроскопического анализа участки колоний фиксировали 2.5% раствором глутаральдегида в какодилатном буфере (рН 7.4), дофиксировали в 2% четырехокиси осмия (OsO_4), дегидратировали этанолом и ацетоном и заключали в эпон-аралдит. Ультратонкие срезы (50-60 нм) получали с помощью ультратома Ultracut-E (Reichert), контрастировали 2% водным раствором уранилацетата и цитрата свинца и изучали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM 100B.

Сканирующая электронная микроскопия

Для сканирующей электронной микроскопии небольшие участки колонии *Obelia longissima* и целых медуз фиксировали 10% формалином на морской воде и 2.5% глутаральдегидом на какодилатном буфере с осмомолярностью 1100 мосм. В дальнейшем материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне, высушивали методом критической точки. Затем образцы монтировали на металлические столики электропроводным клеем и после напыления золотом и платиной исследовали в сканирующих микроскопах Hitachi и LEO-430.

Цитохимические исследования

Для выявления активности щелочной фосфатазы использовали принятый для эмбриональных стволовых клеток млекопитающих протокол с некоторыми модификациями методики применительно к использованному материалу (Исаева и др., 2003).

Иммунохимические исследования

Для метода непрямого авидин-биотинового пероксидазного иммунохимического мечения (PCNA) парафиновые срезы толщиной 5-10 мкм депарафинировали, устраняли неспецифическое окрашивание (фон). Для увеличения проницаемости мембран прогревали препараты с водным раствором детергента. Препараты, находящиеся в растворе детергента, охлаждали до комнатной температуры, промывали бидистиллированной водой, нагретой до 37°C. Затем предварительно окантованные препараты инкубировали в растворе 3% перекиси водорода на 2 М фосфатном буфере и промывали троекратно в бидистиллированной воде.

Для связывания первых (специфических) антител с тканевым антигеном препараты инкубировали во влажной камере с моноклональными антителами мыши (monoclonal mouse anti-PCNA antibodies, clone PC 10, ready-to-use) при температуре 37°C. Далее многократно промывали дистиллированной водой. Для взаимодействия вторых антител, связанных с биотином, с первыми антителами препараты при температуре 37° С инкубировали со вторыми, биотинилированными антителами (Biotinilated link Dako). Далее отмывали дистиллированной водой. Для взаимодействия вторых антител со стрептавидином-биотинилированной пероксидазой препараты инкубировали со стрептавидин-биотин-пероксидазным комплексом, после чего отмывали дистиллированной водой. Стрептавидин-биотиновый пероксидазный комплекс выявляли с помощью 3,3'-диаминбензидин-тетрахлорида (DAV-chromogen DAKO), приготовленного на 0,02 М фосфатном буфере (pH 7,2). Для активации 3,3'-диаминбензидина-тетрахлорида в раствор добавляли 5

мкл 3% перекиси водорода. Препараты инкубировали на водяной бане при температуре 37°C, промывали дистиллированной водой, докрашивали гематоксилином, обезвоживали по стандартной методике и заключали в бальзам.

Выявление продукта гомолога гена *vasa*

При молекулярно-генетических исследованиях были проведены выделение ДНК, амплификация с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), клонирование и секвенирование. ДНК экстрагировалась из свежего или фиксированного в 96% этиловом спирте материала; проводилась ПЦР-амплификация фрагментов гомологов генов *vasa* семейства DEAD-box, экспрессирующихся в стволовых и половых клетках различных Metazoa (Shukalyuk et al., 2007). С целью проведения молекулярной гибридизации *in situ* на тотальных препаратах столонеров интерны применены смысловые и антисмысловые зонды РНК, синтезированной на клонах фрагментов ДНК, гомологичных гену *vasa* и другим генам семейства DEAD, меченые дигоксигенином (Shukalyuk et al., 2007).

Результаты исследования

***Oscarella malakhovi* (Porifera)**

Бесспикульная губка *Oscarella malakhovi* описана Ересковским (Erescovsky, 2006). Этим автором изучено гистологическое строение и клеточные типы губки, а также бесполое размножение путем почкования.

В июле происходит половое размножение губки и развитие зародышей внутри тела материнской губки.

После окончания периода полового размножения наблюдалось почкование губки. На полутонких срезах губки в этот период найдены скопления археоцитов, участвующих в образовании почек.

Ультраструктурное изучение археоцитов выявляет ядро с диффузным хроматином и крупным ядрышком, ободок цитоплазмы, содержащей

рибосомы, митохондрии и нередко вакуоли. Впервые в цитоплазме археоцитов найдены небольшие герминальные тела типичной морфологии, располагающиеся вблизи ядерной оболочки. По периферии герминальных тел видны полисомные комплексы.

***Obelia longissima* (Cnidaria)**

Интерстициальные и гониальные клетки колониального гидроида *Obelia longissima* обладают ультраструктурной морфологией, типичной для стволовых и половых клеток всех многоклеточных животных: большим ядром с диффузным хроматином и крупным ядрышком, базофильной цитоплазмой, включающей специфические герминальные тела; оогенные клетки содержат также пористые пластинки (Akhmadieva et al., 2005). Наблюдали миграцию стволовых (интерстициальных и первичных половых) клеток внутри столона *O. longissima* и их участие в формировании медузоидного поколения. Клеточный состав столон колонии *Obelia longissima* типичен для гидроидов и включает эпителиально-мышечные эктодермальные и энтодермальные клетки, интерстициальные клетки (i-клетки), а также нематоциты, железистые и нервные клетки.

В почкующейся колонии множество крупных i-клеток мигрирует по мезоглее ценосарка к местам формирования почек; вблизи формирующейся почки и в развивающихся зооидах найдены многочисленные i-клетки характерной морфологии с интенсивно базофильной (при окраске гематоксилином) цитоплазмой, крупным светлым ядром и большим ядрышком. Гониальные клетки *O. longissima* отличимы от i-клеток лишь несколько большим размером; ранние ооциты в развивающихся гонозооидах по размеру (20-30 мкм) в полтора-два раза больше крупных i-клеток. Характерной общей ультраструктурной особенностью как крупных i-клеток, так и гониальных клеток и ооцитов оказываются электронно-плотные герминальные тела. Отличительные особенности ооцитов – крупные фагосомы, содержащие остатки вспомогательных клеток, и пористые

пластинки – типичные для оогенных клеток производные ядерной оболочки, отделенные от нее рядами везикул.

Цитохимическая реакция выявления активности щелочной фосфатазы вызывала избирательное окрашивание гониальных и i-клеток, причем специфическая кирпично-красная окраска таких клеток по цвету и интенсивности подобна окраске культивируемых эмбриональных стволовых клеток мыши, использованных в качестве контроля. Такое избирательное окрашивание выделяло гониальные и i-клетки среди дифференцированных соматических клеток колонии, характеризующихся слабой неспецифической окраской желтого или коричневатого цвета.

Применение иммунохимической реакции для выявления ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) показало, что гониальные и i-клетки отличались от дифференцированных соматических клеток более интенсивным окрашиванием.

Girardia (Dugesia) tigrina (Platyhelminthes)

В лаборатории эмбриологии ИБМ одна из планарий бесполой расы, размножившейся исключительно путем архитомии в течение 40 лет, отложила два кокона; гистологическое и ультраструктурное исследование этой особи показало наличие гонад и гониальных клеток.

Изучение необластов и гониальных клеток планарий бесполой расы и спонтанно сексуализированной особи на ультраструктурном уровне показало присутствие типичных для планарий хроматоидных тел, расположенных вблизи ядерной оболочки, часто у ядерных пор и ранее описанную (Isaeva et al., 2005) трансформацию митохондрий в хроматоидные тела.

***Peltogasterella gracilis, Polyascus polygenea, Peltogaster reticulatus* (Arthropoda)**

Проведено гистологическое и ультраструктурное исследование представителей корнеголовых ракообразных (Crustacea: Rhizocephala) –

Peltogasterella gracilis, паразита раков-отшельников, и *Polyascus polygenea*, паразита прибрежного краба. За счет бесполого размножения у некоторых видов корнеголовых на паразитической стадии их жизненного цикла развивается колониальная организация – уникальное явление не только для класса ракообразных, но и для всего типа членистоногих. Внутри каждой почки столона формируется компактный кластер недифференцированных стволовых клеток, такие же клетки поодиночке мигрируют внутри столона. По нашим данным, стволовые клетки корнеголовых ракообразных обладают морфологическими чертами, общими для эмбриональных, стволовых и половых клеток других многоклеточных животных: высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, крупным ядром с деконденсированным хроматином, крупным ядрышком, тонким ободком интенсивно базофильной цитоплазмы с детерминантами зародышевой (половой) плазмы характерной ультраструктурной морфологии. После формирования зачатков бластозооидов стволовые клетки мигрируют в развивающийся яичник будущей экстерны, становясь первичными половыми клетками.

Таким образом, тотипотентные стволовые клетки колониальных корнеголовых ракообразных служат предшественниками как соматических, так и половых клеток и тем самым обеспечивают их уникальную для представителей членистоногих репродуктивную стратегию с реализацией бесполого и полового размножения.

У корнеголового *Peltogaster reticulatus*, имеющего, как правило, одну экстерну, в интерне найдены столоноподобные структуры и три-четыре зачатка экстерн; наиболее развитые зачатки содержали вителлогенные ооциты. Таким образом, этот вид корнеголового также оказался колониальным. Вероятно, зрелая экстерна подавляет развитие зачатков, становящееся возможным в случае ее утраты.

Репродуктивная стратегия колониальных ракообразных вовлекает трехступенчатый каскад количественного умножения потомства: бесполое размножение путем почкования столона интерны, повторное развитие

множественных экстерн и повторные циклы полового размножения каждой экстерны.

Цитохимическая реакция выявления активности щелочной фосфатазы у дробящихся эмбрионов *Polyascus polygenea* вызывала наиболее интенсивное окрашивание герминальных тел, выявляя их присутствие в каждом бластомере.

Применение метода молекулярной гибридизации *in situ* выявило избирательную специфическую экспрессию РНК гомолога гена *vasa* в герминальных телах дробящихся эмбрионов *Polyascus polygenea*.

***Botryllus tuberatus* (Chordata)**

Морфология бластозоидов колониальной асцидии *Botryllus tuberatus* типична для описанной ранее у представителей рода *Botryllus*. Почка, развивающаяся при паллеальном почковании на латеральной стороне материнского бластозоида, снаружи покрыта эпидермисом, локально связанным с внутренним атриальным (перибранхиальным) эпителием. Внутренний клеточный слой неоднороден и включает, помимо эпителиальных клеток, плотную клеточную массу с морфологическими признаками недифференцированных эмбриональных стволовых клеток. Такие клетки содержат крупное ядро с диффузным хроматином и большим плотным ядрышком; объем цитоплазмы невелик относительно размера ядра.

Цитоплазма стволовых клеток содержит митохондрии, многочисленные рибосомы; явные морфологические признаки цитодифференциации отсутствуют. В цитоплазме некоторых стволовых клеток ранних почек *B. tuberatus* найдены небольшие электронно-плотные тела, контактирующие с ядерной оболочкой, сходные не с крупными герминальными гранулами других исследованных представителей беспозвоночных, но с мелкогранулярным материалом нуаж (nuage), нередко встречающимся у позвоночных. Такие мелкие перинуклеарные тельца, сходные с герминальными, встречаются на срезах стволовых клеток; найдены также

центриоли. Изолированные клетки подобной морфологии найдены внутри кровеносных сосудов колонии *B. tuberatus*. Цитохимическая реакция выявления активности щелочной фосфатазы вызывала интенсивное окрашивание развивающихся почек и части клеточной популяции гемоцитов в сосудах и сосудистых ампулах, причем специфическая кирпично-красная окраска таких клеток по цвету и интенсивности подобна окраске культивируемых эмбриональных стволовых клеток мыши, использованных ранее в качестве контроля. По крайней мере часть окрашенных клеток популяции гемоцитов – клетки с крупным ядром и ядрышком и узким ободком интенсивно окрашенной цитоплазмы.

Заключение

У беспозвоночных животных с бесполом размножением стволовые клетки способны дифференцироваться как в соматические клетки, так и в гаметы. Способность стволовых клеток беспозвоночных дифференцироваться в половые клетки позволяет причислить их к тотипотентным, подобным клеткам половой линии – вне зависимости от широты спектра их соматических производных. Подобны общая морфология тотипотентных (плюрипотентных) стволовых клеток, включающая и ультраструктурный уровень (герминальные тела), подвижность, способность к самообновлению путем митотической репродукции, экспрессия гена *vasa*, активность щелочной фосфатазы. Половые и тотипотентные стволовые клетки – привилегированные, «хищные» клетки, склонные к «паразитизму», как это показано на колониальных асцидиях (Pancer et al., 1995; Stoner, Weissman, 1996; Laird, De Tomaso, 2004/2005). Эти клетки способны к конкуренции и подвержены естественному отбору у химерных организмов, например, химерных колоний асцидий (Stoner et al., 1999; Buss, 1999; Weissman, 2000; Laird et al., 2005). Первичные половые и тотипотентные (мультипотентные) стволовые клетки способны к обширным миграциям в

пределах организма и «хomingу» с конечной локализацией в гонадах или местах бесполого размножения или ранения организма.

Обнаружение в ранних почках асцидий *B. tuberatus* недифференцированных стволовых клеток снимает теоретические проблемы, связанные с предполагавшимся ранее развитием производных всех трех зародышевых листков из одного лишь эпителиального слоя – атриального эпителия – при паллеальном почковании ботриллид (Berrill, 1961; Иванова-Казас, 1978). Асцидии рода *Botryllus*, как и колониальные корнеголовые ракообразные, оказываются встроенными в общий ряд многоклеточных животных, репродуктивная стратегия которых включает бесполое размножение, реализуемое за счет резервных, стволовых клеток.

Показано, что кодирующие детерминацию клеток половой линии гены эволюционно консервативны у различных исследованных представителей Metazoa от гидроидов до млекопитающих (Mochizuki et al., 2001; Shibata et al., 1999). Селективная экспрессия продукта гена, родственного гену *vasa* – эволюционно консервативного маркера и детерминанта клеток половой линии – выявлена не только в клетках половой линии, но и в плюрипотентных интерстициальных клетках гидры (Mochizuki et al., 2001), тотипотентных необластах планарий (Shibata et al., 1999), а также в тотипотентных стволовых и эмбриональных клетках корнеголовых ракообразных (Shukalyuk et al., 2007).

Высокий уровень активности щелочной фосфатазы служит маркером эмбриональных стволовых клеток и первичных половых клеток млекопитающих и других представителей позвоночных (см. Исаева и др., 2003; Shukalyuk et al., 2005); разработанный на млекопитающих метод идентификации эмбриональных стволовых клеток успешно применен нами для выявления стволовых клеток беспозвоночных животных. Высокая активность щелочной фосфатазы обнаружена в интерстициальных клетках, а также гониальных клетках гидроида *O. longissima*, ранних почках и части популяции гемоцитов асцидии *B. tuberatus*, а также стволовых клеток

исследованных видов колониальных корнеголовых. Наши данные – первое свидетельство общности этой функциональной характеристики у размножающихся бесполом путем животных столь различных типов, как кишечнополостные, членистоногие и хордовые.

Специфическая избирательная экспрессия РНК гомолога гена *vasa* в герминальных телах всех или большинства бластомеров дробящихся эмбрионов корнеголового *P. polygenea* свидетельствует о тотипотентности бластомеров и означает радикальную перестройку раннего развития, типичного для членистоногих животных и всей ветви Ecdysozoa – скачок от детерминированного мозаичного дробления с ранним выделением полового зачатка к регулятивному развитию.

Тотипотентные стволовые клетки животных с бесполом размножением, как и клетки половой линии, происходят в раннем эмбриогенезе от тотипотентных бластомеров или их производных, сохранивших тотипотентность. Мы полагаем, что эволюционно и онтогенетически родственные тотипотентные эмбриональные, первичные половые и стволовые клетки относятся к популяциям резервных клеток, сохраняющих неограниченный морфогенетический потенциал и способных к реализации полной программы развития.

Таким образом, литературные и наши собственные данные свидетельствуют об эволюционном консерватизме и общности морфофункциональной организации клеток половой линии и стволовых клеток, а также субклеточных и молекулярных основ тотипотентности и потенциального бессмертия стволовых и половых клеток Metazoa от губок и гидроидов до млекопитающих. Самообновляющийся резерв стволовых клеток беспозвоночных с бесполом размножением – клеточная основа репродуктивной стратегии, включающей половое и бесполое размножение.

Выводы

1. В цитоплазме археоцитов (стволовых клеток) губки *Oscarella malakhovi* (Porifera) впервые обнаружены герминальные гранулы; показано участие археоцитов в почковании этого вида.
2. В цитоплазме больших интерстициальных клеток колониального гидроида *Obelia longissima* (Cnidaria) найдены герминальные гранулы, выявлена специфическая экспрессия активности щелочной фосфатазы и ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA).
3. В необластах (стволовых клетках) и гониальных клетках планарии *Girardia (Dugesia) tigrina* (Platyhelminthes) найдены герминальные гранулы типичной морфологии.
4. Стволовые клетки колониального корнеголового ракообразного *Polyascus polygenea* (Arthropoda) впервые обнаружены и исследованы нами. В стволовых клетках корнеголового *Peltogasterella gracilis* обнаружены герминальные гранулы типичной морфологии; стволовые клетки этого вида проявляют специфическую экспрессию щелочной фосфатазы и ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA). Специфическая избирательная экспрессия продукта гена *vasa* обнаружена в герминальных гранулах всех или большинства бластомеров дробящихся эмбрионов *Polyascus polygenea*.
5. Впервые найдены и описаны стволовые клетки асцидии с паллеальным почкованием *Botryllus tuberatus* (Chordata); эти клетки содержат мелкие герминальные гранулы, сходные с материалом nuage позвоночных животных, и проявляют избирательную активность щелочной фосфатазы.
6. Самообновляющийся резерв тотипотентных стволовых клеток – клеточная основа репродуктивной стратегии, включающей половое и бесполое размножение; такие клетки обладают эволюционно консервативными морфофункциональными характеристиками, общими для эмбриональных, стволовых клеток и клеток половой линии Metazoa.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Isaeva V.V., Shukalyuk A.I., Trofimova (Akhmadieva) A.V., Korn O.M., Rybakov A.V. The structure of colonial interna in *Sacculina polygenea* (Crustacea: Cirripedia: Rhizocephala) // Crustacean Research. 2001. № 30. P. 134-147.
2. Корн О.М., Шукалюк А.И., Трофимова (Ахмадиева) А.В., Исаева В.В. Репродуктивная стадия жизненного цикла корнеголового ракообразного *Polyascus polygenea* (Crustacea: Cirripedia) // Биология моря. 2004. Т. 30, № 5. С. 380-392.
3. Корн О.М., Ахмадиева А.В., Рыбаков А.В. Шукалюк А.И. Уровень зараженности краба *Hemigrapsus sanguineus* паразитическим ракообразным *Polyascus polygenea* (Crustacea: Cirripedia) в заливе Восток Японского моря // Биология моря. 2005. Т. 31, № 3. С. 155-158.
4. Akhmadieva A.V., Shukalyuk A.I., Isaeva V.V. Interstitial cells in reproductive strategy of colonial hydroid *Obelia longissima* // The American Society for Cell Biology, 45th Annual Meeting, San Francisco, 2005. P. 752a.
5. Исаева В.В., Шукалюк А.И., Ахмадиева А.В. Стволовые клетки беспозвоночных животных с репродуктивной стратегией, включающей бесполое размножение // Биология моря. 2007. Т. 33, № 1. С. 3-10.
6. Ахмадиева А.В., Шукалюк А.И., Александрова Я.Н., Исаева В.В. Стволовые клетки в бесполом размножении колониальной асцидии *Botryllus tuberatus* // Биология моря. 2007. Т. 33, № 3. С. 217-222.
7. Исаева В.В., Шукалюк А.И., Ахмадиева А.В., Александрова Я.Н. Эволюционный консерватизм морфофункциональной организации тотипотентных стволовых клеток Metazoa // Цитология. (Тезисы докладов и сообщений II съезда общества клеточной биологии. Санкт-Петербург). 2007. Т. 49, № 9. С. 751.

АХМАДИЕВА

Анна Владимировна

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ С РЕПРОДУКТИВНОЙ СТРАТЕГИЕЙ,
ВКЛЮЧАЮЩЕЙ БЕСПОЛОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук