

## УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ГЕРМИНАТИВНЫХ И ЖЕЛТОЧНЫХ ГРАНУЛ В ООЦИТАХ И ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ГОЛОТУРИИ *APOSTICHOPUS JAPONICUS*

© А. А. Реунов, Я. Н. Александрова

Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток; электронный адрес: [arkadiy\\_reunov@hotmail.com](mailto:arkadiy_reunov@hotmail.com)

Проведено электронно-микроскопическое исследование желточных и герминативных гранул в ооцитах и эмбриональных клетках голотурии *Apostichopus japonicus*. Путем анализа особенностей формирования и утилизации желточных гранул выявлены ультраструктурные критерии, позволяющие отличать глобулы формирующегося и утилизирующегося желтка от герминативных гранул. На основании полученных результатов мы полагаем, что идентификация элементов зародышевой плазмы в ооцитах и эмбриональных клетках *A. japonicus* вполне возможна с использованием только метода ультраструктурного анализа и не требует использования молекулярных маркеров.

Жизненный цикл многоклеточных животных сопряжен с биогенезом субстанции, характеризующейся общим названием «зародышевая плазма», которая закономерно присутствует в клетках, дифференцирующихся по половому пути, и, как показывают некоторые исследования, прерывается на линии ооцит—эмбрион—сперматогенез (Reunov, Rice, 1993; Hodgson, Reunov, 1994; Reunov, Klepal, 2004), но является непрерывной на линии ооцит—эмбрион—оогенез (Mahovald, 1977; Strome, Wood, 1982; Исаева, Реунов, 2001). Учитывая, что роль зародышевой плазмы в дифференциации половых клеток все еще не выяснена, изучение ее ультраструктурной изменчивости в прерывающемся и непрерывном циклах является одним из подходов к пониманию механизма функционирования данной субстанции. Исследование зародышевой плазмы осложняется присутствием морфологически близких микроирирующих структур, появляющихся при образовании и утилизации желтка. Формирование желтка происходит в ооцитах, а процесс его утилизации осуществляется в раннем эмбриогенезе. В силу недостаточности данных степень сходства раннего и позднего желтка с элементами зародышевой плазмы не является точно установленной и требует тщательного исследования. Если удастся выявить достоверные ультраструктурные различия между желточными и герминативными гранулами, путь исследования половых детерминантов будет более легким.

В задачи настоящего исследования входит детальное сравнение структуры формирующихся и утилизирующихся желточных гранул со структурными единицами зародышевой плазмы в ооцитах и бластомерах голотурии *A. japonicus*.

### Материал и методика

Экземпляры голотурии *A. japonicus* собирали в зал. Восток Японского моря (в районе МБС «Восток») ИБМ ДВО РАН) в мае—июне 2003 г. Образцы гонад для транс-

миссионной электронной микроскопии фиксировали в 2.5%-ном глутаральдегиде на 0.05 М какодилатном буферном растворе с добавлением NaCl до тоничности 1100 миллиосмоль, затем постфиксировали 2%-ным тетроксидом осмия на том же буферном растворе. После промывки буферным раствором материал дегидратировали в серии спиртов и ацетоне и заливали в смолу Spurr. Тонкие срезы делали на ультратоме Reichert Ultracut E, контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и изучали в трансмиссионном электронном микроскопе JEOL JEM 100B.

Бластулы *A. japonicus* были получены и приготовлены для электронно-микроскопического исследования Юшиным и сотрудниками (1993).

### Результаты

Формирование желтка в ооцитах. Согласно нашим наблюдениям, желток в ооцитах трепанга представлен темными и более светлыми округлыми гранулами (рис. 1, а). На начальном этапе формирования оба типа гранул возникают из мелких пузырьков (рис. 1, б), которые, вероятно, поглощаются ооцитом в процессе пиноцитоза (Айзенштадт, 1984), но также продуцируются диктиосомами комплексов Гольджи (рис. 1, в), присутствующими в цитоплазме развивающейся женской половой клетки. Вокруг агрегатов, возникших из мелких пузырьков, появляется мембрана (рис. 1, з), после чего данные структуры уже можно считать везикулами, благодаря дальнейшему слиянию которых (рис. 1, д) и формируются электронно-плотные желточные гранулы (рис. 1, е). В некоторых случаях можно наблюдать инкорпорацию в электронно-плотные агрегаты электронно-светлых везикул (рис. 1, ж), которые отпочковываются от концевых участков пористых пластинок (рис. 1, з) и в избытке присутствуют в цитоплазме. Данные везикулярные комплексы формируют желточные гранулы, отличающиеся более светлым содержанием (рис. 1, и).

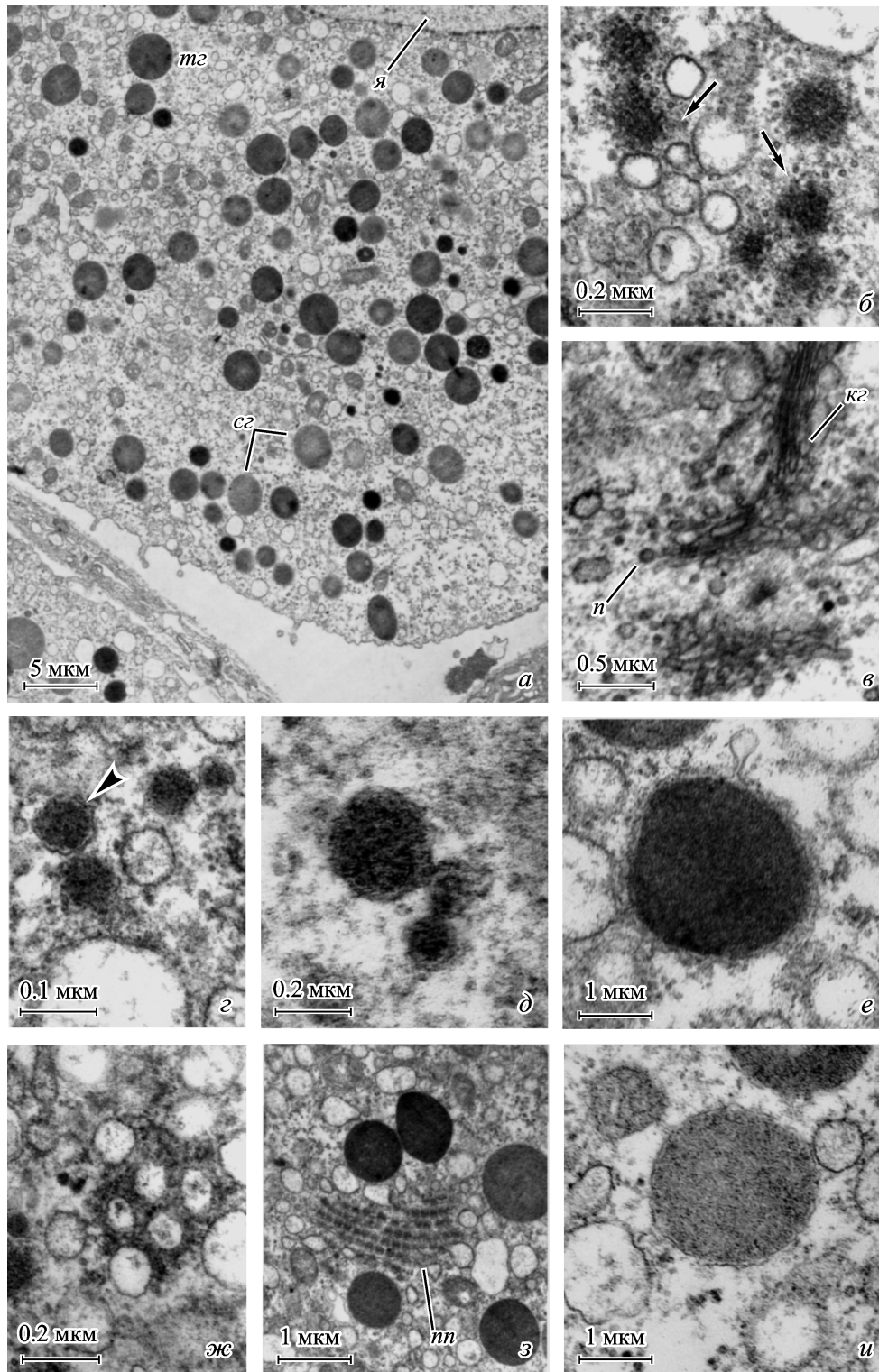


Рис. 1. Формирование желточных гранул в ооците *Apostichopus japonicus*.

*a* — ооцит на стадии созревания; *б* — агрегаты мелких электронно-плотных пузырьков (указаны стрелками); *в* — продуцирование мелких электронно-плотных пузырьков цистернами комплекса Гольджи; *г* — образование общей мембраны (головка стрелки) вокруг агрегатов мелких электронно-плотных пузырьков; *д* — слияние электронно-плотных везикул; *е* — темная желточная гранула; *ж* — встраивание электронно-светлых везикул в агрегаты мелких электронно-плотных пузырьков; *з* — пористые пластинки в цитоплазме ооцита; *и* — светлая желточная гранула. *тг* — темные гранулы желтка; *сг* — светлые гранулы желтка, *я* — ядро, *кг* — комплекс Гольджи, *п* — пузырек, *пт* — пористая пластинка.



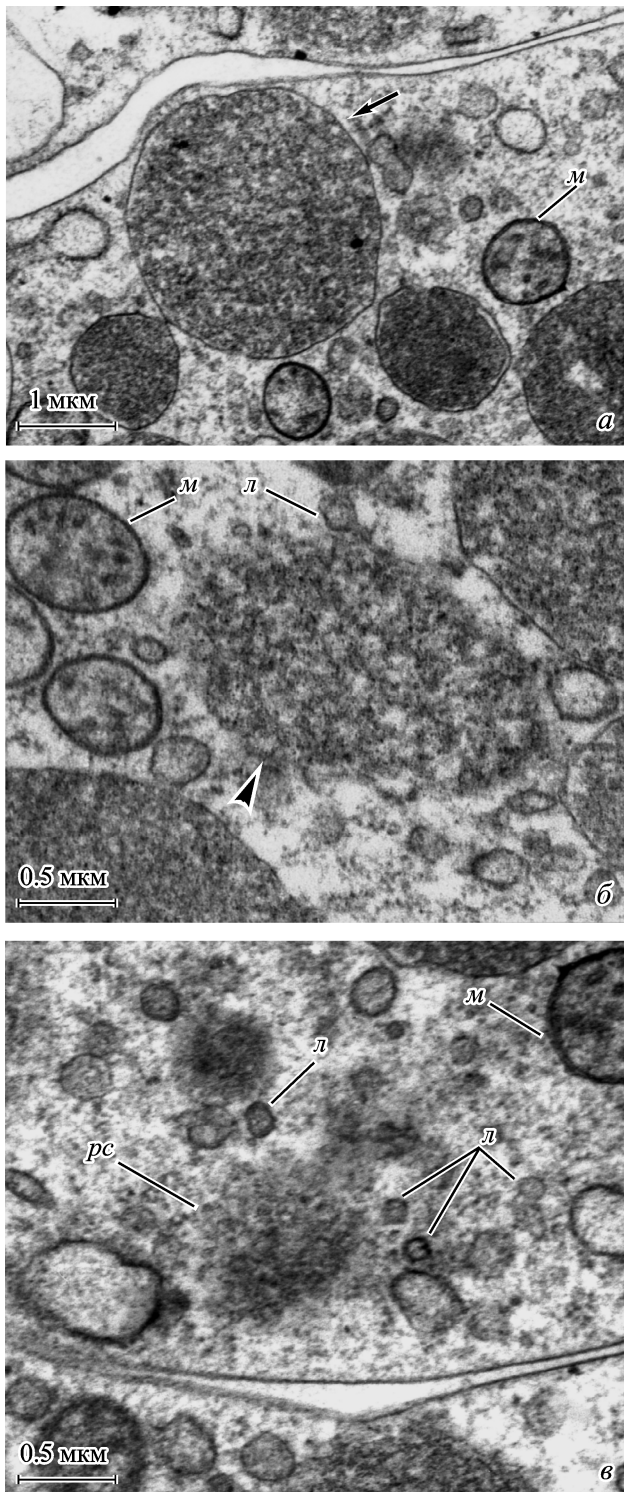


Рис. 2. Утилизация светлых желточных гранул в бластуле *Apostichopus japonicus*.

*a* — светлая желточная гранула (стрелкой показано наличие мембраны); *b* — утилизирующаяся светлая желточная гранула (головка стрелки показывает отсутствие мембраны), окруженная лизосомами; *в* — рассеивание материала светлой желточной гранулы. *л* — лизосома, *м* — митохондрия, *рс* — рассеивающаяся светлая гранула.

Утилизация желтка в раннем эмбриогенезе. В клетках бластулы можно наблюдать гранулы как светлого, так и электронно-плотного желтка. Гранулы светлого желтка изначально окружены мембраной

(рис. 2, *a*), которая постепенно утрачивается (рис. 2, *б*). Согласно нашим наблюдениям, происходит постепенное рассеивание материала светлых гранул, в результате чего они значительно уменьшаются в размерах (рис. 2, *в*) и постепенно исчезают. Как правило, утилизирующиеся светлые гранулы окружены лизосомными везикулами (рис. 2, *б, в*).

Желточные электронно-плотные гранулы (рис. 3, *a*) также подвергаются рассеиванию, но этот процесс происходит иным способом. Изначально деструкция материала гранул, утративших мембрану, происходит в периферической зоне, в результате чего на поперечном срезе структура имеет вид полумесяца (рис. 3, *б*). Полость, возникающая в зоне аутолиза, содержит рыхлый неплотный матрикс (рис. 3, *б*). Аутолитический процесс заканчивается полным превращением электронно-плотных полумесяцев в матрикс, поступающий в цитоплазму, в результате чего в клетках бластулы видны светлые зоны (рис. 3, *в*).

Герминативные гранулы в ооцитах и эмбриональных клетках. В процессе ультраструктурного исследования ооцитов и бластомеров трепанга было показано, что характерной особенностью данных клеток является наличие рыхлых, не окруженных мембраной электронно-плотных гранул (рис. 4, *a*), морфологически соответствующих структурам, в англоязычной литературе характеризуемым как «germinal bodies» (см.: Saffman, Lascko, 1999; Matova, Cooley, 2001). В ооцитах подобные гранулы не имеют специальной зоны локализации и могут быть обнаружены в любом участке цитоплазмы яйцеклетки как вблизи ядра (рис. 4, *б*), так и неподалеку от клеточной мембраны (рис. 4, *в*). Гранулы такого же типа встречаются в эмбриональных клетках, в которых они могут быть легко отличимы от гранул утилизирующегося желтка (рис. 4, *г, д*). От гранул светлого желтка данные структуры отличаются большей электронной плотностью. Электронная плотность герминативных гранул сопоставима с таковой электронно-плотных гранул желтка, но желточные гранулы никогда не принимают морфологических очертаний, характерных для герминативных гранул.

## Обсуждение

Поскольку для иглокожих достаточно хорошо известно о поступлении молекулярного предшественника желтка — вителлогенина — в ооциты экзогенно внутри пиноцитозных пузырьков, а также о синтезе части желтка эндогенно при участии аппарата Гольджи и пористых пластинок (Айзенштадт, 1984; Unuma et al., 1998; Yokota et al., 2003), наши данные, демонстрирующие, что в ооцитах *A. japonicus* гранулы желтка формируются из мелких пузырьков, не являются принципиально новыми. Тем не менее нужно подчеркнуть, что у *A. japonicus* формирующиеся желточные гранулы на первый взгляд кажутся глыбками электронно-плотного материала, который мог бы сравниваться с субстанцией половых детерминантов. Однако электронно-микроскопическое исследование при больших увеличениях позволяет рассмотреть пузырьчатую структуру таких скоплений; кроме того, для них является характерным ореол близлежащих пузырьков, вероятно, встраивающихся в формирующуюся гранулу желтка.

Как правило, при описании желтка морских ежей речь идет о структурах единого типа. Так, деградация желтка у морского ежа *Hemicentrotus pulcherrimus* трак-

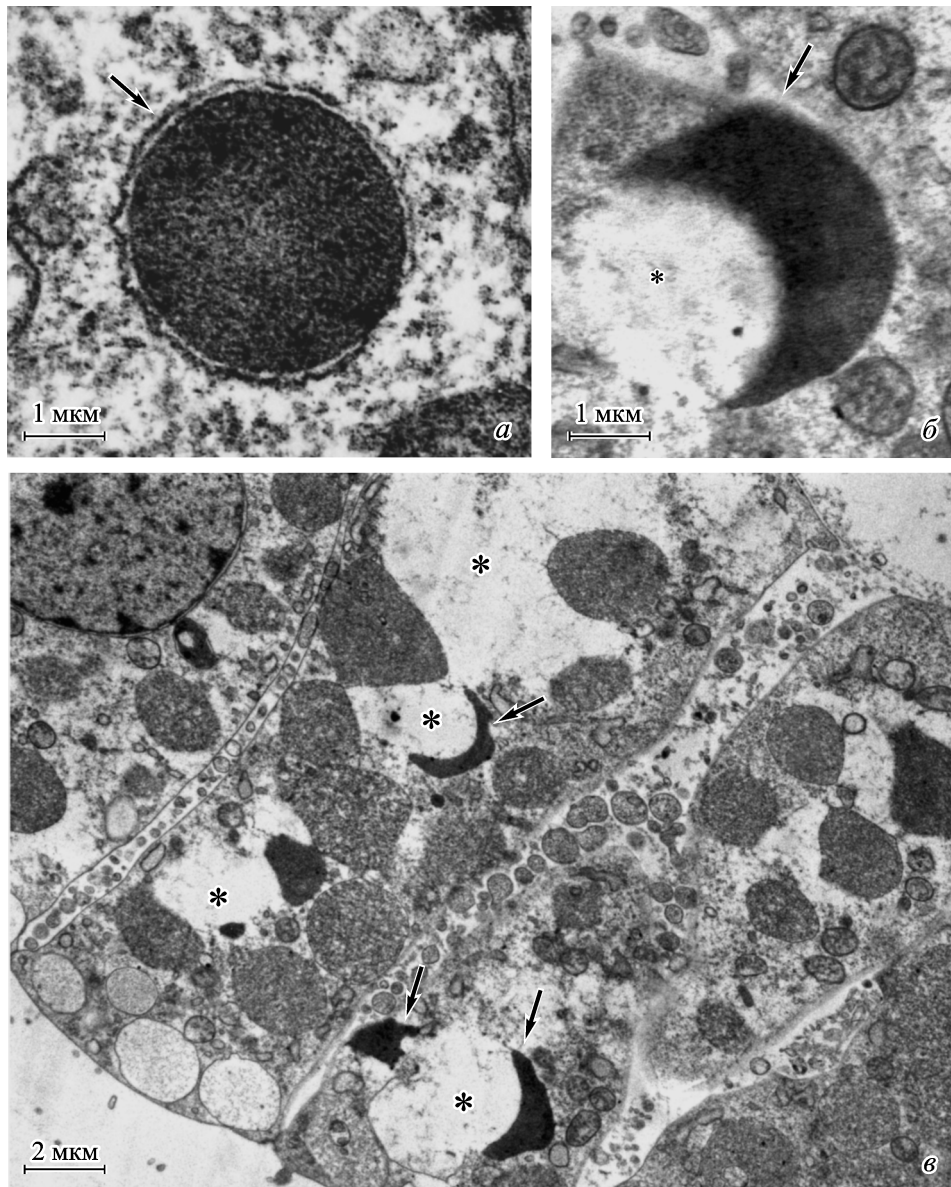


Рис. 3. Утилизация темных желточных гранул в бластуле *Apostichopus japonicus*.

*a* — темная желточная гранула (стрелкой показано наличие мембраны); *б* — темная желточная гранула, подвергающаяся автолизу (звездочкой показана зона периферического автолиза, стрелкой — отсутствие мембраны); *в* — клетки бластулы (зоны периферического автолиза разных размеров показаны звездочками, стрелками показаны утилизирующиеся темные желточные гранулы).

туется как постепенное изменение плотной структуры желточных гранул в светлые (Yokota et al., 1993). Однако согласно нашим наблюдениям, желток в ооцитах трепанга существует в двух морфологических вариациях и различен по способу формирования. Кроме электронно-плотных желточных гранул обнаружены гранулы, заполненные более светлым содержимым, которые возникают за счет присоединения к скоплению мелких пузырьков более крупных электронно-светлых везикул, формируемых пористыми пластинками. Подобные агрегаты также морфологически отличны от половых детерминантов. Формирование желточных гранул двух типов для иглокожих продемонстрировано впервые, и, как показал ультраструктурный анализ, проведенный в настоящей работе, структура формирующихся желточных гранул ни на одном из этапов дифференциации не совпадает со структурой половых детерминантов.

Желточные гранулы в большом количестве встречаются в клетках зародышей иглокожих, в том числе офиур (Глизнуца, Даутов, 2004), морских линий (Chia et al., 1986) и голотурий (Юшин и др., 1993; Dolmatov, Yushin, 1993), однако механизм утилизации желтка достаточно детально рассматривался только у морских ежей. Использование таких методов, как хроматография и электрофорез в SDS-полиакриламидном геле, показало, что на начальных этапах эмбриогенеза морских ежей (бластула, гастрюла) происходит изменение физико-химических свойств основного желточного гликопротеина — вителлогенина, что сопряжено с его переходом в стадию низкомолекулярных белков, содержание которых растет в бластуле и гастрюле (Kari, Rottman, 1985; Armant et al., 1986; Scott, Lennarz, 1989; Yokota et al., 1993, 2003). Согласно подтвержденной некоторыми авторами гипотезе (Mallaya et al., 1992), после оплодотворения яйцеклетки



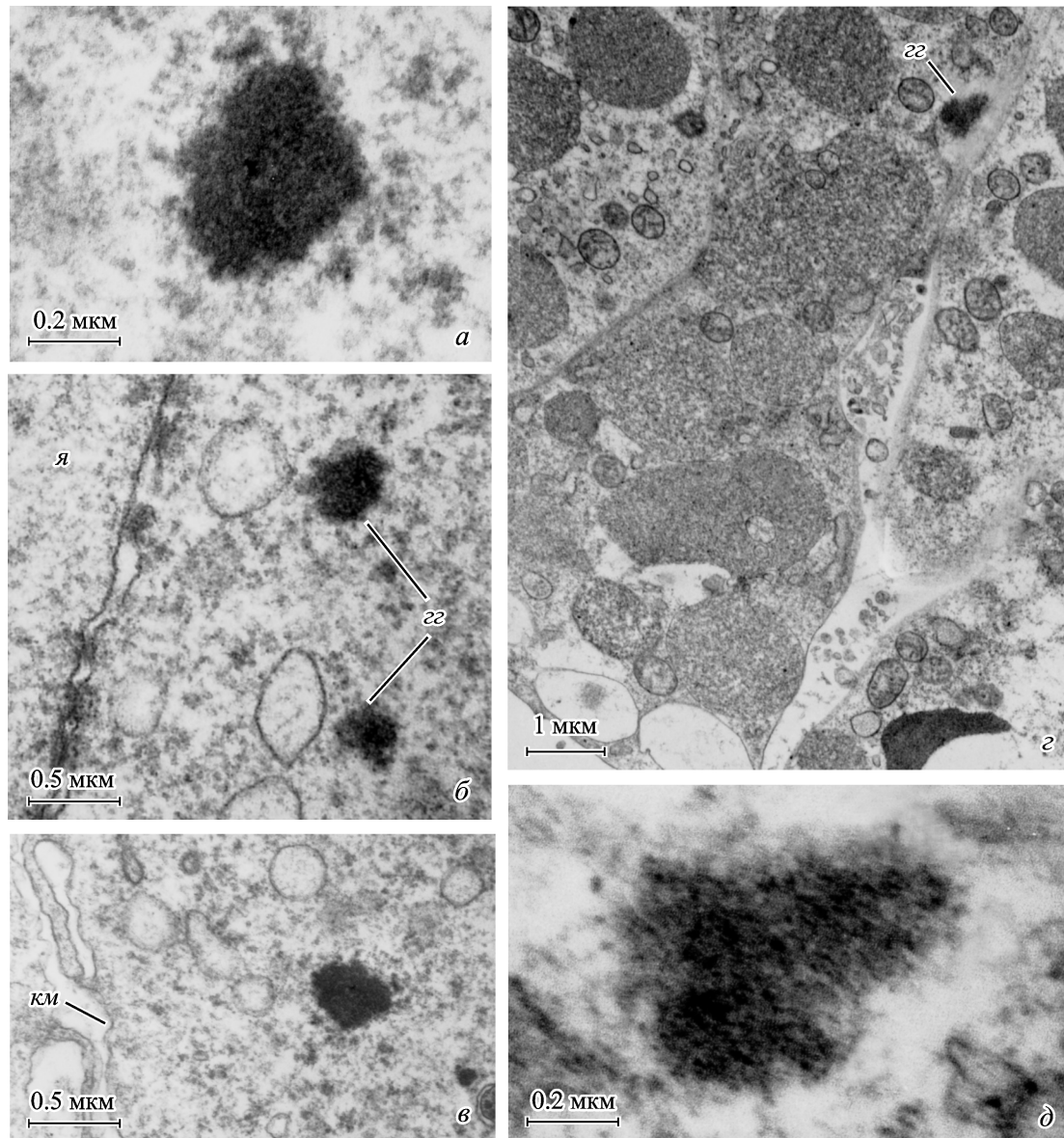


Рис. 4. Герминативные гранулы в ооцитах и бластуле *Apostichopus japonicus*.

*а* — герминативная гранула в ооците; *б* — герминативная гранула вблизи ядра; *в* — герминативная гранула вблизи клеточной мембраны; *г*, *д* — герминативная гранула в бластомере. *гг* — герминативная гранула, *кМ* — клеточная мембрана, *я* — ядро.

в ней и формирующихся клетках эмбриона устанавливается кислотный уровень pH, оптимальный для активации гидролаз, изначально содержащихся в желточных гранулах в интактной форме. Предположительно именно «ацидификация» стимулирует протеолиз вителлогена (Yokota, Kato, 1988; Yokota et al., 1993, 2003; Иванова-Казас, 1995; Глизнуца, Даутов, 2004). Считается, что у морских ежей, несмотря на исчезновение вителлогенина, заметного изменения в количестве и массе желточных гранул не происходит (Armant et al., 1986; Yokota, Kato, 1988). Гранулы желтка могут быть фрагментированы только в процессе электрофореза в SDS-полиакриламидном геле (Yokota et al., 1993). По наблюдениям некоторых исследователей, распад вителлогенина морфологически выражается только в изменении плотности содержимого желточных гранул, которое становится более рыхлым, но при этом сами гранулы сохраняют структурную целостность, по-прежнему окружены мембраной

и именно в таком неизменном виде поступают внутрь первичных лизосом, количество которых увеличивается на более поздних этапах эмбриогенеза (Armant et al., 1986; Yokota, Kato, 1988; Yokota et al., 1993).

У голотурии *A. japonicus* нами был обнаружен морфологически иной способ «поведения» желточных гранул. Показано, что для утилизации материала темных и светлых желточных гранул характерны морфологически специфичные паттерны, сопряженные с потерей наружной мембраны и распадом содержимого. Утилизация светлых гранул происходит путем утраты наружной мембраны (рис. 5, *а–в*) и равномерного уменьшения размера от краев к центру (рис. 5, *г–е*). Растворение темных гранул осуществляется способом, который мы характеризуем как периферический автолиз, в результате которого после потери наружной мембраны (рис. 6, *а, б*) исчезающие гранулы напоминают «полумесяц» (рис. 6, *д*). В обоих случаях результатом деструкции яв-

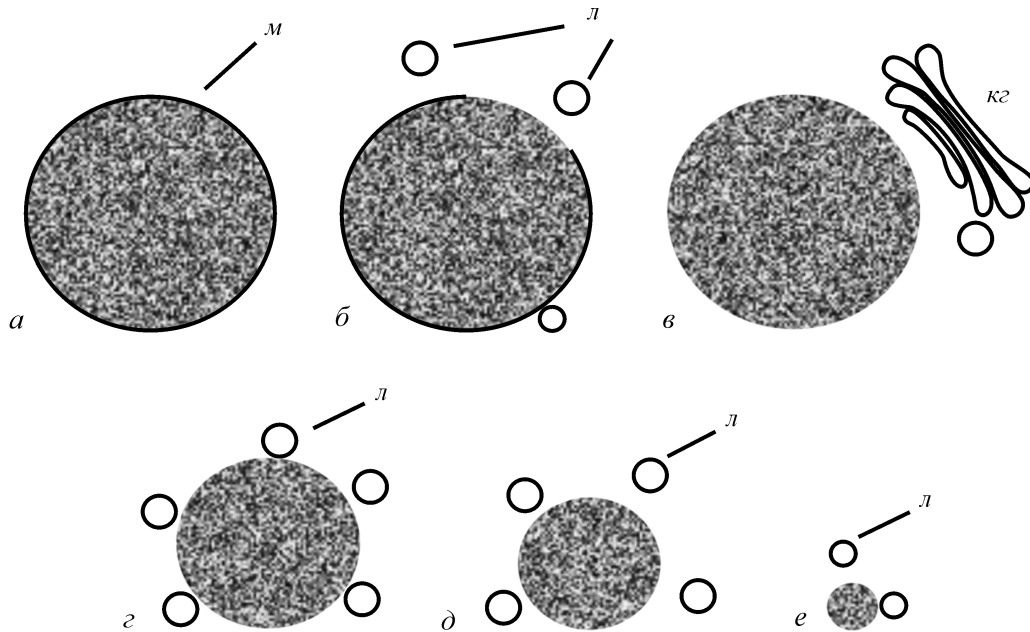


Рис. 5. Схематическое изображение утилизации светлой желточной гранулы в бластуле *Apostichopus japonicus*. а — интактная гранула; б—е — утилизирующаяся гранула. м — мембрана, л — лизосома, кг — комплекс Гольджи.

ляется возникновение рыхлого матрикса, оказывающегося в цитоплазме в свободном состоянии. Не отрицая возможности протеолитической деструкции гранул желтка трепанга, мы не можем не обратить внимание на присутствие мелких электронно-светлых пузырьков, которые, вероятно, являются первичными лизосомами и ферменты которых участвуют в деструкции электронно-светлого желтка (рис. 5, б—е). Нужно подчеркнуть, что сопряженность мелких лизосом с деструкцией желтка ранее не обсуждалась исследователями и в настоящей работе демонстрируется нами впервые. На основании этих данных можно полагать, что у *A. japonicus* комплекс Гольджи не только участвует в синтезе гранул желтка в процессе вителлогенеза, но и играет определенную роль в процессе их исчезновения в эмбриогенезе.

Необходимо подчеркнуть, что гранулы материала, которые встречаются в клетках бластулы и, по нашему мнению, являются материалом зародышевой плазмы, имеют более высокий уровень электронной плотности по сравнению со светлыми гранулами желтка и, следовательно, не могут быть спутаны с последним. В то же время их нельзя отождествлять и с утилизирующимся материалом электронно-плотных гранул, так как деструкция этих структур происходит в соответствии со строго детерминированным паттерном, которому элементы половой линии не соответствуют.

Таким образом, исследование формирования и деструкции желтка в ооцитах и эмбриональных клетках *A. japonicus* показало, что структуры, фигурирующие в обоих процессах, морфологически отличны от цитоплазматического материала, который в соответствии с критериями, отраженными в работах многих авторов (Saffman, Lasko, 1999; Matova, Cooley, 2000; Исаева, Реунов, 2001), является веществом зародышевой плазмы. Можно заключить, что идентификация элементов зародышевой плазмы в ооцитах и эмбриональных клетках *A. japonicus* вполне возможна с использованием только метода ультраструктурного анализа и не требует использования молекулярных маркеров.

Авторы выражают глубокую благодарность В. В. Юшину за любезно предоставленные для настоящего исследования заливки бластул трепанга, а также Д. Фомину за помощь при работе на электронном микроскопе.

Работа выполнена при финансовой поддержке ДО РАН (проект 05-III-A-06-105), Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-49544) и Министерства образования и науки РФ (НШ-1219.2003.4).

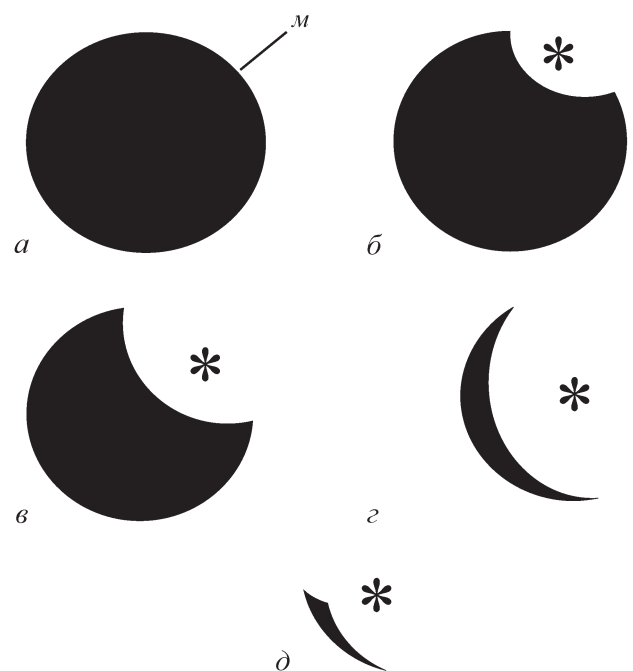


Рис. 6. Схематическое изображение утилизации темной желточной гранулы в бластуле *Apostichopus japonicus*. а — интактная гранула; б—д — утилизирующаяся гранула. м — мембрана; звездочками показаны зоны периферического автолиза.



## Список литературы

- Айзенштадт Т. Б. 1984. Цитология оогенеза. М.: Наука. 247 с.
- Глизнаца Л. А., Даутов С. Ш. 2004. Ультраструктурные особенности эмбриогенеза офиуры *Amphipholis kochi* (LÜTKEN, 1872). Биол. моря. 00(0): 000—000.
- Иванова-Казас О. М. 1995. Эволюционная эмбриология животных. СПб.: Наука. 565 с.
- Исаева В. В., Реунов А. А. 2001. Половая плазма и детерминация клеток половой линии: роль митохондрий. Биол. моря. 27 (4) : 231—237.
- Юшин В. В., Бухарцева Н. В., Малахов В. В. 1993. Электронно-микроскопическое исследование развития дальневосточного трепанга *Stichopus japonicus* от бластулы до диплеврулы. Цитология. 35 (1) : 22—29.
- Armant D. R., Carson D. D., Decker G. L., Welply J. K., Lennarz W. J. 1986. Characterization of yolk platelets isolated from developing embryos of *Arbacia punctulata*. Develop. Biol. 113 : 342—355.
- Chia F.-S., Burke R. D., Koss R., Mladenov Ph. V., Rumrill S. S. 1986. Fine structure of the doliolaria larva of the feather star *Florometra serratissima* (Echinodermata: Crinoidea), with special emphasis on the nervous system. J. Morphol. 189 : 99—120.
- Dolmatov I. Yu., Yushin V. V. 1993. Larval development of *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirota). Asian Marine Biol. 10 : 123—132.
- Hodgson A. N., Reunov A. A. 1994. Ultrastructure of the spermatozoon and spermatogenesis of the brachiopods *Discinisca tenuis* (Inarticulata) and *Kraussina rubra* (Articulata). Invert. Reprod. Develop. 25 : 23—31.
- Ikenishi K. 1998. Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. Develop. Growth Differ. 40 : 1—10.
- Kari B. E., Rottman W. L. 1985. Analysis of changes in a yolk glycoprotein complex in the developing sea urchin embryo. Develop. Biol. 108 : 18—25.
- Mahowald A. P. 1977. The germ plasm of *Drosophila*: an experimental system for the analysis of determination. Amer. Zool. 17 : 551—563.
- Mallaya S. K., Partin J. S., Valdizan M. C., Lennarz W. L. 1992. Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. J. Cell Biol. 117 : 1211—1221.
- Matova N., Cooley L. 2001. Comparative aspects of animal oogenesis. Develop. Biol. 231 : 291—320.
- Reunov A. A., Klepal W. 2004. Ultrastructural study of spermatogenesis in *Phoronopsis harmeri* (Lophophorata, Phoronida). Helgol. Mar. Res. 58 : 1—10.
- Reunov A. A., Rice M. 1993. Ultrastructural observations on spermatogenesis in *Phascolion cryptum* (Sipuncula). Trans. Amer. Microsc. Soc. 112 : 195—207.
- Saffman E. E., Lasko P. 1999. Germline development in vertebrate and invertebrate. Cell. Mol. Life Sci. 55 : 1141—1163.
- Scott L. B., Lennarz W. J. 1989. Structure of a major yolk glycoprotein and its processing pathway by limited proteolysis and are conserved in echinoids. Develop. Biol. 132 : 91—102.
- Strome S., Wood W. B. 1982. Immunofluorescence visualization of germ-line-specific cytoplasmic granules in embryos, larvae, and adults of *Caenorhabditis elegans*. Proc. Nat. Acad. Sic. USA. 79 : 1558—1562.
- Unuma T., Suzuki T., Kurokawa T., Yamamoto T., Akiyama T. 1998. A protein identical to the yolk protein is stored in the testis in male red sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. Biol. Bull. 194 : 92—97.
- Yokota Y., Kato K. H. 1988. Degradation of yolk proteins in sea urchin eggs and embryos. Cell Differ. 23 : 191—200.
- Yokota Y., Kato K. H., Mita M. 1993. Morphological and biochemical studies on yolk degradation in the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. Zool. Sci. 10 : 661—670.
- Yokota Y., Unuma T., Moriyama A., Yamano K. 2003. Cleavage site of a major yolk protein (MYP) determined by cDNA isolation and amino acid sequencing in sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. Comp. Biochem. Physiol. 135 : 71—81.

Поступила 11 II 2005

THE ULTRASTRUCTURAL PATTERNS OF GERMINAL AND YOLK GRANULES IN OOCYTES AND EMBRYONIC CELLS OF THE HOLOTHURIAN *APOSTICHOPUS JAPONICUS*

A. A. Reunov, Ya. N. Alexandrova

Institute of Marine Biology, Far East Branch, RAS, Vladivostok;  
e-mail: arkadiy\_reunov@hotmail.com

The yolk germinal granules in oocytes and embryonic cells of *Apostichopus japonicus* were studied by transmission electron microscopy. Analysis of the features of synthesis and utilization of yolk granules made it possible to reveal ultrastructural criteria to distinguish between granules of the forming and utilized yolk, and germinal granules. Based on these findings, the authors suppose that identification of germ plasm elements in oocytes and embryonic cells of *A. japonicus* is quite possible with ultrastructural analysis only, and does not require utilizing molecular markers.