

АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ НА РАННИХ СРОКАХ РЕГЕНЕРАЦИИ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS* L.

© А. Б. Козлова, О. А. Петухова, Г. П. Пинаев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

В целомической жидкости (ЦЖ) морской звезды *Asterias rubens* обнаружены клетки трех основных типов: агранулоциты (55—80 %), которые различаются по размеру и форме (округлые или овальные) и иногда образуют псевдоподии, гранулоциты (15—45 %) и мелкие клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (до 2 %). Реакция звезды на поранение зависит от степени потери ЦЖ. Клеточный состав циркулирующей жидкости в ответ на незначительную потерю ЦЖ не меняется. Общим ответом звезд на значительную потерю ЦЖ является возрастание доли мелких клеток. После поранения изменяются функциональные характеристики клеток ЦЖ: увеличивается доля клеток с деконденсированным хроматином и окрашенным ядрышком, а целомоциты приобретают способность к образованию сетей при контакте с инородным субстратом. При этом в популяции появляются клетки нового типа (веретеновидные) и увеличивается число гранулоцитов в сетях. Результаты позволяют предположить, что восстановление пула циркулирующих целомоцитов происходит при незначительном ранении за счет запаса уже дифференцированных клеток вне циркуляции, а при более существенных потерях ЦЖ в процесс восстановления включаются так называемые молодые целомоциты, появляющиеся в циркуляции из депонированных недифференцированных клеток.

Ключевые слова: *Asterias rubens*, целомоциты, агранулоциты, гранулоциты, мелкие клетки, регенерация.

Изучение механизмов, лежащих в основе регенерации, приобретает в настоящее время большое значение. Интерес к этому объясняется вопросами, возникающими при лечении с помощью трансплантации тканей, органов и стволовых клеток. Многие закономерности процесса регенерации были исследованы на примере иглокожих, характеризующихся выдающейся способностью к восстановлению частей тела. Этот тип морских беспозвоночных принадлежит к подразделу *Deuterostomia* и может рассматриваться как предковый для хордовых.

Важную роль в регенерации и защитных реакциях иглокожих от различного рода инфекций и повреждений выполняют целомоциты (Догель, 1975; Edds, 1993; Candia, Carnevali, Bonasoro, 2001). Целомоциты циркулируют в составе целомической жидкости (ЦЖ) и способны к фагоцитозу инородных частиц и образованию агрегатов в зонах существенных повреждений тела, затрагивающих целомические каналы. Попытки охарактеризовать клеточный состав ЦЖ предпринимались неоднократно большим количеством исследователей, начиная с конца XIX—начала XX в. В настоящее время предлагаются различные классификации целомоцитов иглокожих и отмечается недостаточное количество исследований, выполненных на морских звездах (Ohuye, 1936; Edean, 1958; Fabre et al., 1969; Fontaine, Lambert, 1975; Kanungo, 1984; Горышина, Чага, 1990; Edds, 1993).

Описанное многообразие клеток ЦЖ для разных классов и даже видов иглокожих в значительной степени связано с тем, что авторы используют разные методы фиксации,

окраски и анализа клеток. Например, подробный морфологический анализ целомоцитов *Asterias rubens* показал, что при разных способах фиксации формулы клеточного состава могут различаться (Jangoux, Vanden Bossche, 1975).

Восстановление пула целомоцитов при повреждении животного происходит достаточно быстро. Предполагается, что у морских звезд регенерация протекает по типу морфаллаксиса, когда новые клетки возникают за счет деления клеток в депо, которыми в данном случае могут служить целомический эпителий и эпидермальный слой шнура радиального нерва (Vanden Bossche, Jangoux, 1976; Thorndyke et al., 2001b). Возможно также, что восстановление пула целомоцитов происходит за счет дедифференцировки и последующей редифференцировки неких клеточных элементов (Candia Carnevali, Bonasoro, 2001). Независимо от гипотезы можно ожидать, что следствием ранения животного будет изменение соотношения клеток разных типов в ЦЖ или же появление клеток с другими морфофункциональными характеристиками и клеток-предшественников.

Собственные наблюдения, а также исследования других авторов показали, что ранение звезды *A. rubens* приводит к возрастанию числа циркулирующих клеток в 3—4 раза через 6 ч после поранения (Vanden Bossche, Jangoux, 1976). Однако многие вопросы, такие как клеточный состав ЦЖ, закономерности восстановления клеточной популяции циркулирующих целомоцитов и особенности реакции в случае потери разного количества ЦЖ, не были исследованы.

Для изучения происхождения целоцитов и их роли в процессе регенерации в настоящей работе была поставлена цель провести сравнительный морфофункциональный анализ клеток ЦЖ в норме и после поранения. Задача заключалась в классификации целоцитов *A. rubens* после окраски азуром и эозином. Оценивали размер клеток и ядер и наличие гранул в цитоплазме. В качестве функциональной характеристики клеток после окраски азуром анализировали конденсацию хроматина и наличие окрашенных ядрышек, а также адгезивные свойства клеток. Для того чтобы установить особенности реакции звезды на потерю разного количества ЦЖ и определить условия, при которых происходят максимальные изменения формулы клеточного состава, морфофункциональный анализ проводили после нанесения ран различного характера и степени тяжести.

Материал и методика

Придонные и прикрепленные к субстрату морские звезды *Asterias rubens* собирали на глубине от 2 до 10 м в Кандалакшском зал. Белого моря в губе Чула, на мысе Картеш на Беломорской биостанции Зоологического института РАН. Животных помещали в большие объемы морской воды в термостатируемой комнате при 10 °С на период не более 24 ч. Для более длительных опытов звезд содержали в садках на глубине 4—5 м. Исследования проводили на звездах радиусом 5—8 см.

В зависимости от характера раны животных делили на следующие группы (5—6 особей в группе). 1. Животные с «легкой» раной (надрезом 0.5 см) луча звезды скальпелем, после нанесения которой звезду сразу помещали в морскую воду. 2. Животные с раной «средней тяжести»; в этом случае звезду помещали на край стола (одним из лучей вниз) таким образом, чтобы ЦЖ переместилась в свешивающийся луч, после чего отрезали кончик луча и давали стечь максимальному количеству ЦЖ. 3. Животные с «тяжелой» раной; в этом случае после максимального вытекания ЦЖ (см. п. 2) проводили замещение ее остатков фильтрованной морской водой с помощью инъекции шприцем и повторяли процедуру промывки дважды через 6 и 12 ч. В качестве контроля было взято 6 интактных звезд.

Клеточный состав ЦЖ, взятой из полости тела, анализировали через 3, 6, 12 и 24 ч, 3 и 7 сут. Сроки были выбраны в соответствии с ранее полученными результатами, показавшими изменение белкового состава и протеолитической активности в ЦЖ *A. rubens* после поранения звезды скальпелем (Воронкина и др., 2000). Во всех случаях отбор ЦЖ осуществляли отсасыванием иглой в шприц.

Для фиксации клеток ЦЖ (200 мкл) отбирали в шприц, наполненный равным объемом 8%-ного формалина, сливали в пластиковые микропробирки, тщательно перемешивали и фиксировали 30 мин. Клетки отмывали от фиксатора дистиллированной водой с помощью центрифугирования, ресуспендировали в воде, раскапывали на стекла, покрытые полилизинем (20 мкг/мл), и высушивали. Перед окраской высушенные препараты размачивали 20 мин в дистиллированной воде.

Окраска азуром и эозином. Препараты окрашивали 0.1%-ным раствором эозина в течение 50 мин, отмывали дистиллированной водой в течение 3—5 мин и окрашивали 0.1%-ным водным раствором азур в течение

20 мин. Далее препараты отмывали дистиллированной водой в течение 5 мин и обезвоживали по 1—2 мин в следующих спиртах: этанол (70 и 96 %), изобутанол и ксилол. В 70%-ном этаноле препараты держали не более 30 с, чтобы избежать вымывания эозина. Затем препараты заключали в канадский бальзам и исследовали под световым микроскопом (об. 100×).

Для приготовления препаратов распластанных целоцитов 50 мкл ЦЖ, не содержащей фиксатора и разбавленной раствором CMFSS (0.5 M NaCl, 0.0026 M KCl, 0.1 M Трис, pH 8.0; Kanungo, 1982) в соотношении 1 : 4, наносили на стекла, покрытые полилизинем. Клетки инкубировали в течение 30 мин при 10 °С, фиксировали 4%-ным формалином (10 мин) и окрашивали гематоксилином Майера в течение 7—10 мин (Кононский, 1976). Краску отмывали инкубацией в дистиллированной воде (5 мин), после чего красили эозином 50 мин. Отмывку, обезвоживание и заключение в канадский бальзам проводили так же, как и в предыдущем случае. Препараты исследовали с помощью световой и фазово-контрастной микроскопии (об. 100×).

Статистическая обработка. Долю разных клеток в препарате считали в 5—10 полях зрения (не менее 300 клеток). Показания усредняли для каждой звезды в отдельности, а также для всех звезд на временную точку. В подсчетах средних значений и 95%-ных доверительных интервалов использовали программу Microsoft Excel 97.

Результаты

Для морфологического анализа клетки целоцитарной жидкости (ЦЖ) сначала фиксировали в суспензионном состоянии и высушивали на полилизине, а потом окрашивали азуром и эозином. Принято считать, что этот способ обработки сохраняет все возможные типы клеток ЦЖ. Результаты окрашивания целоцитов приведены на рис. 1.

В ЦЖ интактных животных были обнаружены клетки следующих морфологических типов: 1) агранулоциты — клетки ЦЖ, не несущие гранул, диаметром 4—7 мкм, ядра диаметром 2—4 мкм, окрашены азуром в синий цвет, могут располагаться либо по центру, либо эксцентрично, цитоплазма имеет слабо-розовый оттенок, окрашена гомогенно, форма клеток варьирует, встречаются клетки округлой или овальной формы, иногда наблюдаются псевдоподии (рис. 1, а); 2) гранулоциты — клетки диаметром 4—7 мкм с гранулами различных форм и размеров (0.5—1.0 мкм), ядра (2—4 мкм) окрашены азуром в синий цвет и могут располагаться либо по центру, либо эксцентрично, цитоплазма имеет слабо-розовый оттенок, гранулы окрашены азуром (рис. 1, б) или эозином (рис. 1, в), клетки округлые или овальные, возможны псевдоподии; 3) мелкие клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, диаметром 3—4 мкм, ядра окрашены азуром в синий цвет, вокруг ядер — тонкий (иногда почти незаметный) слой цитоплазмы, цитоплазма почти не окрашена, редко имеет светло-розовый оттенок (рис. 1, з).

Количественное соотношение клеток этих типов было следующим: агранулоциты — 55—80 %, гранулоциты — 15—45 %, мелкие клетки — до 2 %. Поскольку в препаратах встречались только единичные азурофильные гранулоциты, этот термин относится почти целиком к эозинофильным гранулоцитам. Также следует учесть,

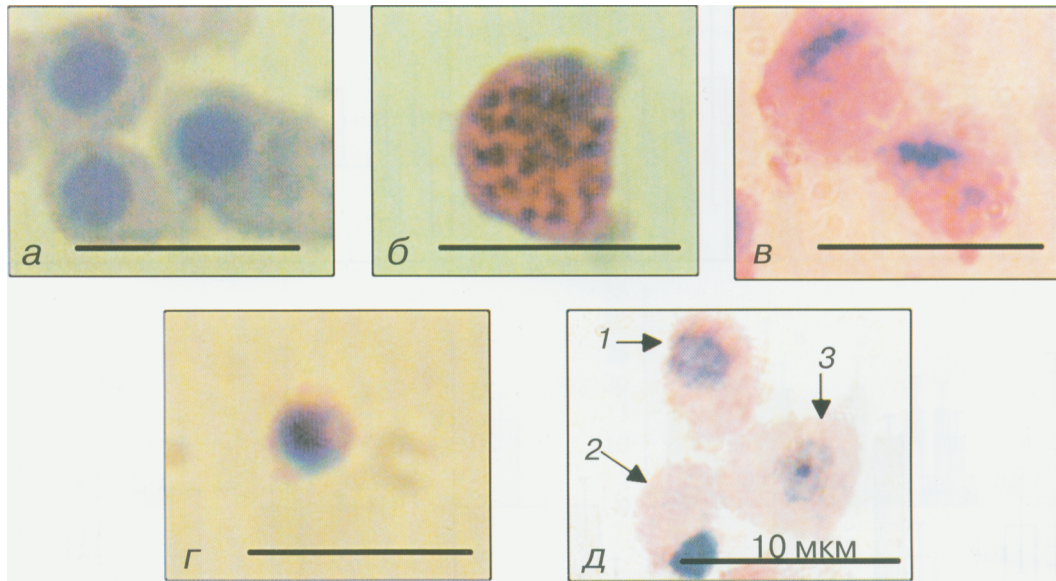


Рис. 1. Клетки целомической жидкости морской звезды *Asterias rubens*.

a — агранулоциты; *б* — азурофильные гранулоциты; *в* — эозинофильные гранулоциты; *г* — мелкие клетки; *д* — клетки с разным состоянием хроматина: 1 — клетки с деконденсированным хроматином, 2 — клетки с конденсированным хроматином, 3 — клетки с деконденсированным хроматином и окрашенным ядрышком в ядре. Суспензию клеток фиксировали 4%-ным параформальдегидом, высушивали на стеклах, покрытых полилизинном, и окрашивали азуром и эозином. Об. 100 ×.

Fig. 1. Cell types in the coelomic fluid of the sea star *Asterias rubens*.

a — agranulocytes; *б* — azurophilic granulocytes; *в* — eosinophilic granulocytes; *г* — small cells; *д* — cells with varying chromatin condensation: 1 — cells with decondensed chromatin, 2 — cells with condensed chromatin, 3 — cells with decondensed chromatin and nucleoli. Cell suspension was fixed with 4 % paraform, drained on polylysine glasses and stained with azur and eosin. Ob. 100 ×.

что некоторые гранулы могли не окраситься ни азуром, ни эозином. Такие целомоциты причисляли к агранулярным при этом методе обработки.

Анализ клеточного состава целомической жидкости после поранения показал, что процентное соотношение разных клеток зависит от того, каким способом были ранены животные и какое количество ЦЖ было потеряно в результате поранения (рис. 2, *a—г*).

У интактных животных при отборе материала шприцем не выявлено изменений клеточного состава ЦЖ через 3, 6, 12 и 24 ч после первого забора ЦЖ (данные не приводятся).

В случае незначительной потери ЦЖ (при легкой ране) после надреза луча у звезд также не выявлено изменений клеточного состава ни на одном из сроков после поранения. Однако становятся более выраженными индивидуальные различия в содержании разных типов целомоцитов в ЦЖ у разных звезд, что проявляется в увеличении в 1.5—2.0 раза доверительного интервала значений среднего по сравнению с контролем (данные не приводятся).

После отрезания кончика луча звезды и вытекания через надрез максимального количества ЦЖ (ранение средней тяжести) количество мелких клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением увеличивается по сравнению с контролем и через 6—24 ч достигает 10—50 % (рис. 2, *a*, белые столбики). Общее число гранулоцитов после этого ранения не отличается от общего числа в контроле (рис. 2, *б*, белые столбики).

После истощения пула целомоцитов (при тяжелом ранении) также происходят существенные изменения клеточного состава ЦЖ: увеличивается доля мелких клеток (до 5—30 %), достигая максимального значения через 12 ч (рис. 2, *a*, темные столбики). Изменений количества гранулоцитов не выявлено (рис. 2, *б*, темные столбики).

Анализ состояния хроматина. Азур и эозин по-разному окрашивали ядра клеток ЦЖ внутри одного типа клеток, что связано с неодинаковым поглощением красителя ядрами, хроматин которых различается по степени конденсации. Этот параметр, а также окрашивание ядрышек в ядре позволяет говорить о различной активности хроматина. В контроле доля клеток со слабо окрашенным деконденсированным хроматином и с ядром диаметром 3—4 мкм (рис. 1, *д*, 1) составляет 10—30 %, клеток с равномерно яркоокрашенным конденсированным хроматином и с ядром диаметром 2—3 мкм (рис. 1, *д*, 2) — 60—90 %; клетки с окрашенным в ядре диаметром 2—4 мкм встречаются в контроле не у всех звезд, их доля составляет 0—5 % (рис. 1, *д*, 3).

В случае интактных звезд, а также при легком ранении изменений в содержании клеток с различным состоянием хроматина через 3—24 ч после поранения не выявлено (данные не приводятся). При ранении средней тяжести (рис. 2, *в*, белые столбики) наблюдается аналогичная картина. После истощения пула целомоцитов в случае тяжелого ранения доля клеток с деконденсированным хроматином возрастает от 10—25 % в контроле

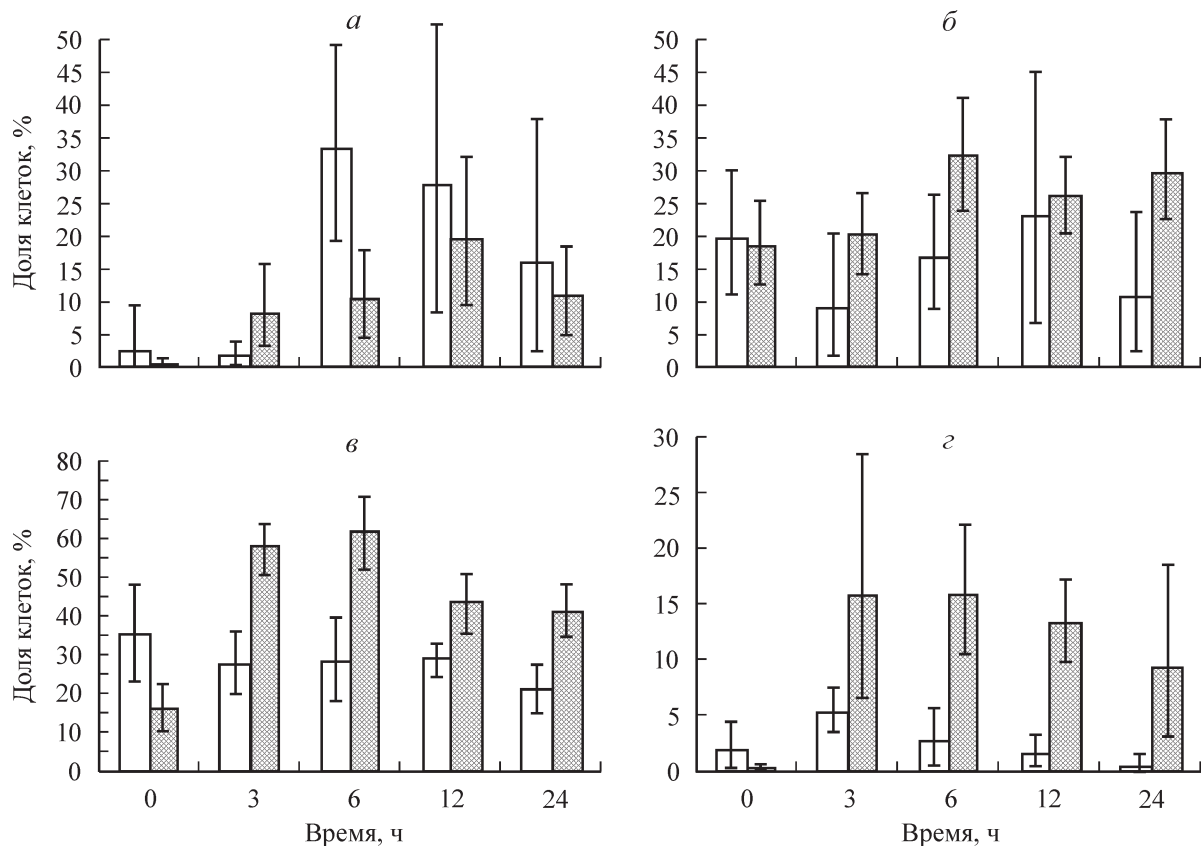


Рис. 2. Динамика клеточного состава целомической жидкости *Asterias rubens* в течение 24 ч после поранения.

а — мелкие клетки; *б* — гранулоциты; *в* — клетки с деконденсированным хроматином; *г* — клетки с ядрышком в ядре. Белые столбики — рана средней тяжести, темные столбики — тяжелая рана. Подсчитывали долю клеток соответствующего типа после фиксации суспензии клеток и окраски азуром и эозином. Вертикальные отрезки — доверительные интервалы ($P < 0.05$).

Fig. 2. Dynamics of cell composition in the coelomic fluid of *Asterias rubens* 24 h after injuring.

a — small cells; *b* — granulocytes; *v* — cells with decondensed chromatin; *z* — cells with nucleoli in the nucleus. White columns — middle injury, dark columns — hard injury. The share of particular cell types was counted after azur—eosin staining of fixed cell suspension. Confidence intervals are given ($P < 0.05$).

до 50—65 % через 3 ч после нанесения раны и затем постепенно снижается до 35—50 % через 24 ч (рис. 2, *в*, темные столбики). Доля клеток, в ядрах которых окрашены ядрышки, возрастает до 5—30 % через 3 ч после поранения (рис. 2, *г*, темные столбики). Корреляции между количеством гранулоцитов и целомоцитов хроматином не обнаружено.

При ранении средней тяжести изменения клеточного состава ЦЖ анализировали после окрашивания клеток азуром и эозином на более длительных сроках (рис. 3). Доля мелких клеток возрастает через 12 ч и сохраняется на уровне около 10 % через 3 и 7 сут после ранения (рис. 3, *а*, 1). Количество гранулоцитов сильно варьирует, и изменений в течение 3 ч—7 сут после ранения не выявлено (рис. 3, *б*, 1).

Анализ состояния хроматина показывает, что суммарное число клеток с деконденсированным хроматином (рис. 3, *в*, 1, белые столбики) и клеток, в которых на фоне деконденсированного хроматина прокрашено ядрышко (рис. 3, *в*, 1, темные столбики), возрастает на ранних сроках за счет доли клеток с окрашенным ядрышком, причем клетки этого типа присутствуют в ЦЖ через 3 и 7 сут после ранения.

Индивидуальные изменения клеточного состава ЦЖ после ранения. Статистический ана-

лиз показывает, что доверительный интервал средних значений числа клеток разных типов увеличивается при оценке популяций целомоцитов после ранения, что предполагает индивидуальные различия в реакции звезд на воздействие. Для того чтобы проверить это предположение, изменения клеточного состава ЦЖ после отрезания кончика луча анализировали индивидуально в каждой из 5 звезд после окрашивания клеток азуром и эозином. Результаты приведены на рис. 3 параллельно с данными, усредненными для 5 звезд (рис. 3, *а*, 1, *б*, 1, *в*, 1). Общей тенденцией для каждой звезды являются увеличение доли мелких клеток через 12 ч и сохранение высокого уровня этих клеток через 3 и 7 сут (рис. 3, *а*, 2). При анализе индивидуальных изменений числа гранулоцитов общих тенденций выявить не удалось (рис. 3, *б*, 2). Общая для всех звезд тенденция наблюдается при анализе состояния хроматина: в каждой звезде возрастает доля клеток с деконденсированным хроматином (рис. 3, *в*, 2). Для удобства презентации мы объединили на этом рисунке в одну группу клетки с деконденсированным хроматином, в которых ядрышко либо прокрашивается, либо нет, в отличие от данных рис. 3, *в*, 1, где эти клетки представлены отдельными диаграммами.

Клетки ЦЖ после расплывания. Важной физиологической чертой клеток ЦЖ является их способ-

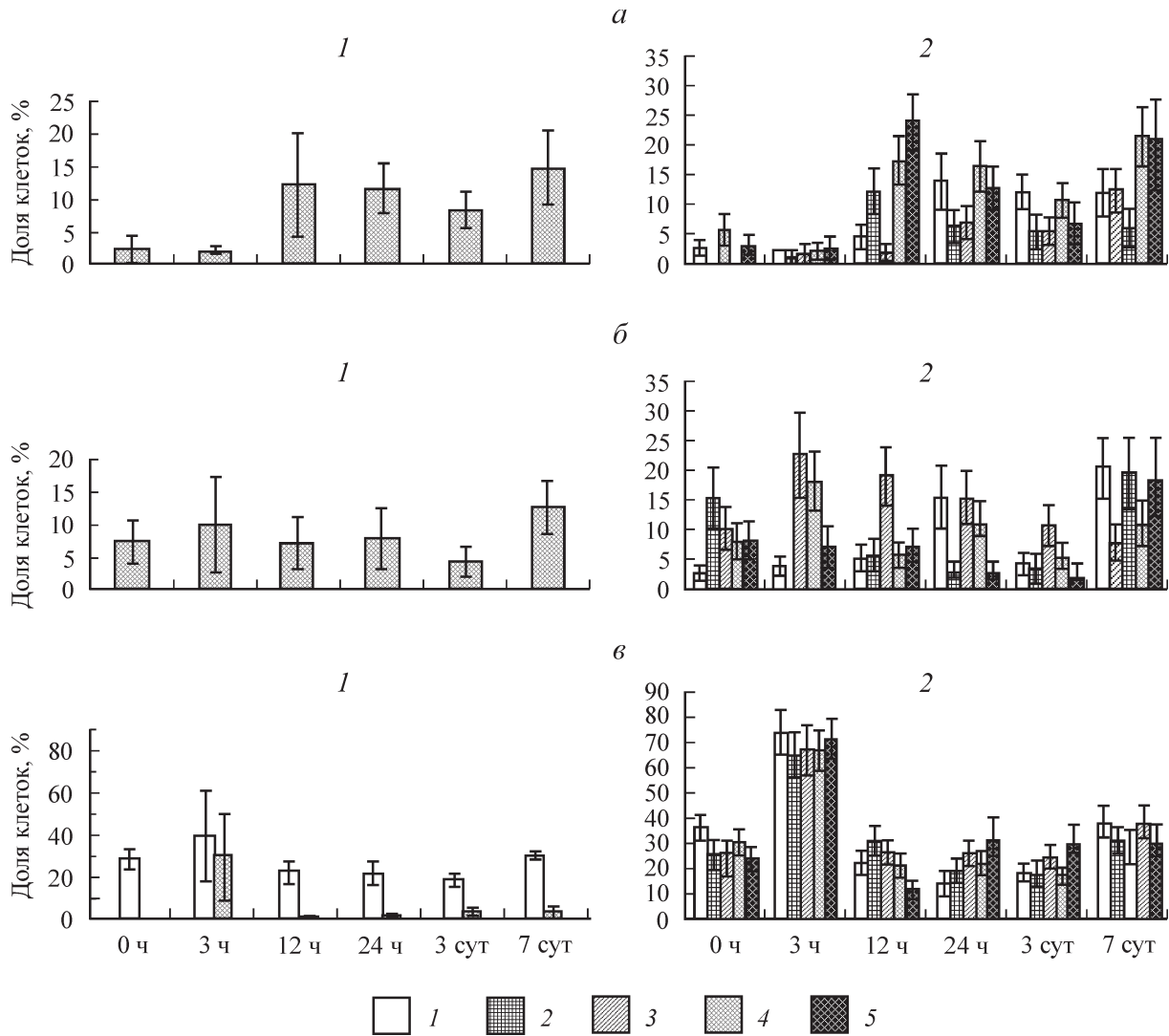


Рис. 3. Динамика клеточного состава целомической жидкости *Asterias rubens* через 3 ч—7 сут после отрезания одного из лучей звезды (ранение средней тяжести).

a, б — усредненные для 5 звезд (1) и индивидуальные (2) изменения. *a* — мелкие клетки; *б* — гранулоциты; *в* — клетки с разным состоянием хроматина: 1 — усредненные данные для клеток с деконденсированным хроматином (белые столбики) и деконденсированным хроматином и окрашенным ядрышком (серые столбики); 2 — индивидуальные изменения для клеток с деконденсированным хроматином (включая клетки с окрашенным ядрышком). Подсчитывали долю клеток соответствующего типа после окрашивания азуром и эозином. Вертикальные отрезки — доверительные интервалы ($P < 0.05$).

Fig. 3. Injury induced dynamics of the coelomic fluid cell composition 3 h—7 days after a middle injury.

Average for 5 sea stars (1) and individual (2) changes. *a* — small cells, *б* — granulocytes, *в* — cells with varying chromatin condensation: 1 — average data for cells with decondensed chromatin (white columns), and cells with decondensed chromatin and stained nucleoli (grey columns), 2 — individual changes for cells with decondensed chromatin (including cells with nucleoli). The cell share was counted after azur—eosin staining of fixed cell suspension. The axis «x» — the time lapse after injury. Confidence intervals are given ($P < 0.05$).

ность к адгезии, которая служит основой для сгусткообразования и заживления ран у иглокожих (Исаева, Коренбаум, 1989). Для характеристики субпопуляции клеток, обладающих адгезивными свойствами, анализировали клетки, зафиксированные после распластывания на покровном стекле. ЦЖ с клетками разбавляли раствором CMFSS (искусственная морская вода без Ca^{2+} и Mg^{2+}) в 5 раз, чтобы замедлить процесс агрегации клеток в суспензионном состоянии, и распластывали на полилизине. С помощью фазово-контрастной микроскопии после окрашивания гематоксилином и эозином удалось обнаружить, что в контроле на полилизине распластывается незначительное количество клеток ЦЖ, при этом встре-

чаются сильно (рис. 4, *a*) и слабо (рис. 4, *б*) распластанные клетки. Доминируют слабо распластанные клетки (до 95 %). Все клетки лежат отдельно друг от друга, в цитоплазме клеток можно обнаружить плотные круглые гранулы и вакуоли различных форм и размеров.

После ранения средней тяжести число прикрепившихся клеток увеличивается приблизительно в 50 раз, и целомоциты приобретают способность к формированию сетей, в которых агрегаты клеток связаны клеточными мостиками (рис. 4, *в*). В сетях были выявлены целомоциты двух основных типов — клетки агрегатов и веретеновидные клетки. Клетки в агрегатах имеют более или менее округлую форму и несколько коротких псевдоподий.

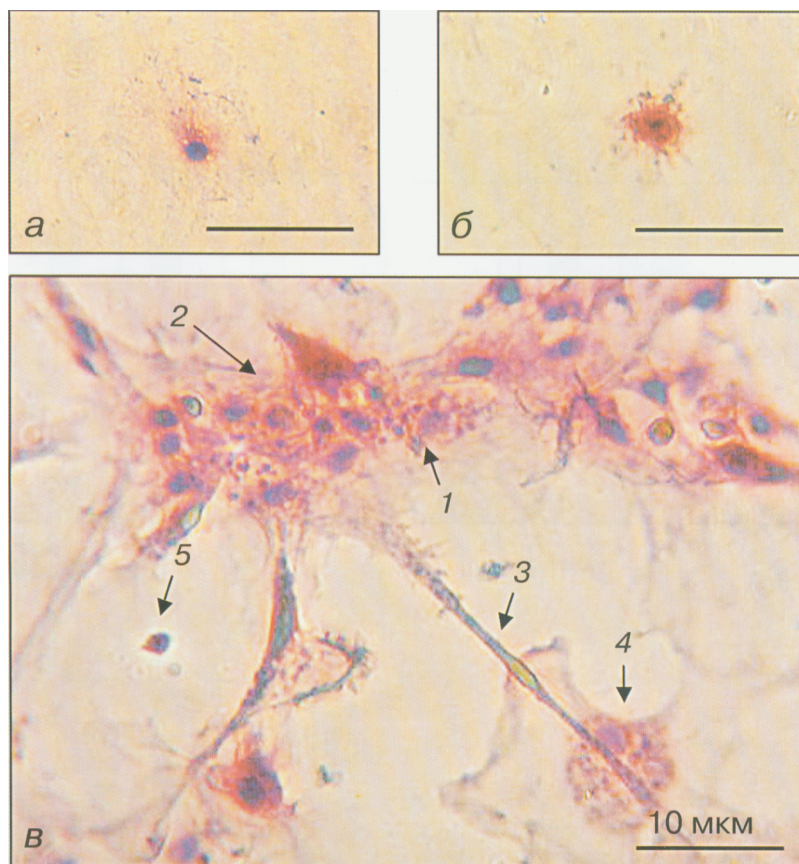


Рис. 4. Клетки целомической жидкости *Asterias rubens*, обладающие адгезивными свойствами.

Сильно (а) и слабо (б) распластанные клетки контрольных звезд; в — образование «сети» целомоцитами после поранения звезды: 1 — гранулоциты, 2 — агранулоциты, 3 — веретеновидные клетки, 4 — распластанные клетки вне сетей, 5 — мелкие клетки. Окраска гематоксилином и эозином после фиксации распластанных клеток. Об. 100 ×.

Fig. 4. Adhesive cells of the coelomic fluid of *Asterias rubens*.

а — strong, and б — weak types of cell spreading in control sea stars; в — formation of coelomocyte nets after injury: 1 — granulocytes, 2 — agranulocytes, 3 — fusiform cells, 4 — spread cells beyond the nets, 5 — small cells. Hematoxylin—eosin staining after fixation of spread cells. Ob. 100 ×.

Эти клетки могут быть с гранулами (рис. 4, в, 1) и без них (4, в, 2). Веретеновидные клетки размером 10—40 мкм имеют вытянутую форму и образуют соединения между агрегатами за счет двух полярно вытянутых псевдоподий (рис. 4, в, 3). В агрегатах такие клетки выявить не удастся. Веретеновидные клетки иногда содержат гранулы. Встречаются отдельно лежащие клетки, сходные с сильно распластанными клетками в контроле, в цитоплазме которых часто видны вакуоли и гранулы (рис. 4, в, 4). Вне сетей были обнаружены также мелкие круглые клетки (рис. 4, в, 5) с тонким слоем цитоплазмы, сходные с мелкими клетками, окрашенными азуром и эозином (рис. 1, з). Мелких клеток в контроле не обнаружено, а после нанесения раны их доля не превышала 1 %.

В ходе заживления раны наблюдается изменение состава клеток, принимающих участие в образовании сетей. Доля гранулоцитов относительно агранулоцитов снижается между 6 и 12 ч после ранения (рис. 5, а). Доля веретеновидных клеток относительно клеток в агрегатах и сильно распластанных клеток существенно падает через 6 ч после нанесения раны (с 30—35 до 15—25 %;

рис. 5, б). Способность к образованию сетей целомоцитов наблюдали и при других способах поранения (данные не приводятся).

Обсуждение

В работе проведен морфологический анализ и исследованы некоторые функциональные характеристики клеточных элементов целомической жидкости (ЦЖ) морской звезды *A. rubens*. После окрашивания фиксированных клеток ЦЖ были обнаружены мелкие клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, гранулоциты и агранулоциты. Клетки петалоидного и филоподиального типов и веретеновидные клетки наблюдали после распластывания клеток.

Клетки, подобные перечисленным выше, обнаружены в ЦЖ *A. rubens* и другими авторами, которые описали клетки двух основных типов: лимфоциты разной формы (везикулярные лимфоциты, на долю которых приходилось 70—75 %, лимфоциты филоподиального или петалоидного типа с короткими псевдоподиями, составляю-

щие 10—15 %, и мелкие лимфоциты — 10—15 %) и очень редкие веретеновидные клетки (Jangoux, Vanden Bossche, 1975). Термин «лимфоциты» употребляется для клеток, способных к взаимопревращениям. Для мелких лимфоцитов характерно небольшое количество цитоплазмы. Везикулы и псевдоподии могут возникать у клеток различной формы. Выдвигается предположение о том, что мелкие клетки являются родоначальниками всех остальных типов клеток и что необратимая трансформация происходит при переходе от мелких клеток к дифференцированным и от циркулирующих клеток с короткими псевдоподиями к распластанным (Fontaine, Lambert, 1975; Jangoux, Vanden Bossche, 1975). Авторы отмечают, что у вида *A. rubens* отсутствуют морулярные клетки, обнаруженные у морских ежей и гологурий (Johnson, 1969) и описанные также позднее другими авторами (Купер, 1980; Карр, Coffaro, 1982).

Присутствие гранулоцитов в ЦЖ описано для близкого к *A. rubens* вида *Asterias amurensis* (Коренбаум, Воробьев, 1988; Коренбаум, 1989).

Предложенная нами классификация не исчерпывает всего многообразия клеток ЦЖ. Например, в одну группу «агранулоцитов» были объединены округлые и овальные клетки и клетки с разным расположением ядра (по центру или эксцентрично). Мы позволили себе такое объединение, поскольку одной из задач исследования являлся поиск условий эксперимента, при которых происходят максимальные изменения в популяции целомоцитов, связанные с выбросом клеток-предшественников из предполагаемых депо, а не всеобъемлющий морфологический анализ клеточного состава ЦЖ. Проведенный функциональный анализ, а именно оценка состояния конденсации хроматина и наличие окрашенного ядрышка, а также анализ адгезивной субпопуляции клеток ЦЖ позволили получить дополнительную информацию об особенностях физиологической реакции звезды, связанных со стимуляцией процесса заживления ран.

Анализ изменений клеточного состава ЦЖ после поранения показал, что реакция звезды прежде всего зависит от степени поранения. Так, нанесение раны иглой или нанесение легкой раны скальпелем не приводит к изменению клеточного состава, являясь, по-видимому, недостаточным воздействием для запуска сложных механизмов восстановления клеточных популяций. Вероятно, изменения в клеточном составе ЦЖ при этих типах воздействия происходят локально в зоне поражения и не затрагивают всю циркулирующую ЦЖ (Thorndyke et al., 2001a).

Главным ответом на значительную потерю ЦЖ было увеличение доли мелких клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Именно эти клетки рассматриваются многими авторами как ювенильные, молодые, клетки-предшественники (Jangoux, Vanden Bossche, 1975; Коренбаум, Воробьев, 1988). Ядра этих клеток могут содержать как конденсированный, так и деконденсированный хроматин. Мелкие клетки обнаружены также в субпопуляции клеток, способных распластываться, хотя их число существенно меньше (менее 1 %), чем было обнаружено в суммарной популяции клеток, фиксированных в суспензионном состоянии при этом способе поранения в той же самой временной точке (не менее 10 %). Эти факты говорят о неоднородности субпопуляции мелких клеток и появлении новых свойств у части этих клеток после поранения, например способности к адгезии. Мы предполагаем, что мелкие клетки с различными фун-

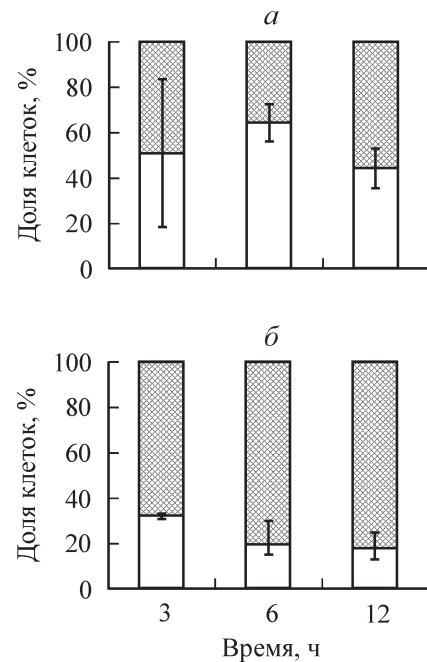


Рис. 5. Изменение доли гранулоцитов и веретеновидных клеток в субпопуляции распластанных клеток после нанесения раны.

а — соотношение гранулоцитов (светлые столбики) и агранулоцитов (темные столбики); б — соотношение веретеновидных (светлые столбики) и распластанных (темные столбики) клеток, в том числе клеток в агрегатах.

Fig. 5. Changes in the share of granulocytes and fusiform cells in a spread cell subpopulation after injury.

а — ratios of granulocytes (white columns) and agranulocytes (dark columns); б — ratios of fusiform (white columns) and spread cells, including cells in aggregates (dark columns).

циональными характеристиками представляют собой последовательный ряд единой клеточной линии.

Увеличение числа мелких клеток после значительной потери ЦЖ может говорить о восполнении пула из камбиальных органов клеточных депо, в качестве которых рассматриваются целомический эпителий, аксиальный орган или тидемановы тельца (Догель, 1975; Candia Carnevali, Bonasoro, 2001; Thorndyke et al., 2001b). Мы не исключаем также того, что часть мелких клеток может быть фрагментами других клеток, содержащими ядро. Такие ядра-клетки описаны у других представителей иглокожих, они являются производными мышечных клеток, способны делиться, мигрировать и дифференцироваться (Dolmatov, Ginanova, 2001). Как уже упоминалось, многие авторы объясняют крупное ядро и небольшое количество цитоплазмы, а также недифференцированность молодым возрастом клетки и их способность давать начало новым популяциям (Jangoux, Vanden Bossche, 1975; Коренбаум, Воробьев, 1988; Thorndyke et al., 2001b). Однако гистогенетические отношения целомоцитов *A. rubens* не прослежены до сих пор.

Значительная потеря ЦЖ приводит не только к увеличению числа мелких клеток, но и к возрастанию доли клеток с деконденсированными ядрами. Неодинаковый характер окраски ядер азуром связан с различными состояниями конденсации хроматина и может говорить об изменении синтетической активности клетки после поранения (Роскин, Левинсон, 1957). Подтверждением

синтетической активности ядер с деконденсированным хроматином является появление окрашенного ядрышка, которое связано с активным синтезом рибосомальной РНК, участвующей в синтезе белков. Но наличие окрашенного ядрышка, так же как и деконденсированное состояние хроматина, не коррелировало с наличием в клетке гранул, окрашенных эозином, т. е. гранул, содержащих белок. Таким образом, предположение о том, что целоמוциты с деконденсированным хроматином синтезируют белки, которые накапливаются в эозинофильных гранулах, не подтверждается. Вероятно, процессы накопления гранул не столь однозначны. Кроме того, деконденсация хроматина может быть связана не только с синтезом белков, но и с различным состоянием ДНК в фазах клеточного цикла. Ни одной клетки, содержащей метафазную пластинку, на препаратах целомоцитов найдено не было.

Изменение клеточного состава ЦЖ при регенерации наблюдали у нескольких видов голотурии после эвисцерации — удаления глотки (Елисейкина, Магарламов, 2002). Для трех видов этих иглокожих наиболее многочисленной группой клеток ЦЖ (до 60 %) является группа ювенильных, малодифференцированных клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, которые, по-видимому, являются аналогом мелких целомоцитов, наблюдаемых нами. Характерным признаком этих клеток голотурии является наличие ядра каплевидной формы с небольшим углублением, в котором располагаются структуры клеточного центра. Наличие клеточного центра может указывать на недавно прошедшее деление клеток (Магарламов, 2004). Другими, реже встречающимися субпопуляциями клеток являются амебоциты, морулярные клетки и незначительное количество жагутиковых и кристаллических клеток (Елисейкина, Магарламов, 2002).

У голотурии через 6 ч после эвисцерации, сопровождающейся значительной потерей ЦЖ, наблюдается возрастание количества клеток в ЦЖ, при этом основную массу составляют ювенильные клетки. Позднее доля ювенильных целомоцитов уменьшается, а доля амебоцитов и морулярных клеток увеличивается. Авторы полагают, что восстановление клеточного пула у дальневосточного трепанга происходит не за счет митозов, а в результате миграции низкодифференцированных клеток из тканей стенки тела (Магарламов, 2004). В наших опытах высокий уровень мелких клеток сохранялся в течение 7 сут после ранения, причем общее количество мелких клеток существенно меньше, чем у голотурии.

Наиболее характерные изменения морфологии целомоцитов после нанесения раны можно наблюдать при распластывании клеток на стекле. Способность целомоцитов *A. rubens* к образованию сетей, исследованная в предыдущей работе (Ворокина и др., 2003), связана с их активацией после потери ЦЖ. Образование сети подтверждает способность целомоцитов образовывать тромбы после ранения. Исследование динамики образования сетей могло бы дать больше информации о механизмах образования тромба.

У интактных звезд при исследовании распластанных целомоцитов с помощью фазового контраста почти не обнаруживаются гранулоциты. Увеличение их числа после поранения, возможно, свидетельствует об увеличении синтетической активности клеток. На препаратах целомоцитов от интактных и подопытных звезд, фиксированных до распластывания и окрашенных азуром и

эозином, не наблюдается такого количества гранулоцитов. Возможно, с помощью фазового контраста обнаружены гранулоциты, гранулы которых не окрасились ни азуром, ни эозином, поскольку не имеют электрического заряда. Возможно также и то, что увеличение числа гранулоцитов именно в сети является специфическим ответом на ранение.

Полученные результаты позволяют предположить, что восстановление клеточного пула циркулирующих целомоцитов происходит при незначительном ранении (укол иглой у интактных животных и легкое ранение) за счет запаса уже дифференцированных клеток вне циркуляции. При более существенных потерях ЦЖ (при ранении средней тяжести и тяжелом ранении) в процесс восстановления включаются так называемые молодые целомоциты, клетки-предшественники, появляющиеся в циркуляции из депо недифференцированных клеток.

Таким образом, проведенный морфофункциональный анализ позволил создать собственную классификацию клеточного состава ЦЖ *A. rubens* и проследить динамику изменений состава при поранении. Полученная экспериментальная модель максимального истощения пула клеток ЦЖ может служить базой для исследования происхождения, развития и дифференцировки популяции целомоцитов *A. rubens*.

Авторы выражают благодарность А. М. Горбушину за плодотворные дискуссии и помощь в освоении гистологических методов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-48251), Программы ведущих научных школ (НШ-1244.2003.4) и С.-Петербургского научного центра.

Список литературы

- Воронкина И. В., Сакута Г. А., Шарлаимова Н. С., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 2000. Факторы целомической жидкости морской звезды *Asterias rubens* и их биологическая активность. Цитология. 42 (4) : 330—331.
- Воронкина И. В., Шубин Н. А., Пинаев Г. П. 2003. Изучение биологической активности компонентов целомической жидкости на примере образования агрегатов целомоцитами морской звезды в норме и под действием фракций целомической жидкости. Цитология. 45 (9) : 861.
- Горышина Е. Н., Чага О. Ю. 1990. Сравнительная гистология тканей внутренней среды с основами иммунологии. Л.: ЛГУ. 320 с.
- Догель В. А. 1975. Зоология беспозвоночных. М.: Высшая школа. 560 с.
- Елисейкина М. Г., Магарламов Т. Ю. 2002. Морфология целомоцитов голотурий *Apostichopus japonicus* (Aspidohirota: Stichopodida) и *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae). Биология моря. 28 : 214—219.
- Исаева В., Коренбаум Е. 1989. Иммуниетет иглокожих. Биология моря. 6 : 3—14.
- Кононский А. И. 1976. Гистохимия. Минск: Вища школа. 280 с.
- Коренбаум Е. С. 1989. Ультраструктура целомоцитов морской звезды *Asterias amurensis*. Цитология. 31 (10) : 1165—1170.
- Коренбаум Е. С., Воробьев В. А. 1988. Клетки целомической жидкости морской звезды *Asterias amurensis*. Биология моря. 1 : 27—33.
- Кунер Э. 1980. Сравнительная иммунология. М.: Мир. 422 с.

- Магарламов Т. 2004. Целомоциты иглокожих и их роль в защитных реакциях: Автореф. канд. дис. Владивосток. 26 с.
- Роскин Г. И., Левинсон Л. Б. 1957. Микроскопическая техника. М.: Советская наука. 467 с.
- Candia Carnevaki M. D., Bonasoro F. 2001. Microscopic overview of Crinoid regeneration. *Micr. Res. Technique*. 55 : 403—426.
- Dolmatov I. Yu., Gnanova T. T. 2001. Muscle regeneration in holothurians. *Micr. Res. Technique*. 55 : 452—463.
- Edds K. 1993. Cell biology of echinoid coelomocytes. I. Diversity and characterization of cell types. *J. Invert. Pathol.* 61 : 173—178.
- Endean R. 1958. The coelomocytes of *Holothuria leucospilota*. *Q. J. Microsc. Sci.* 99 : 47—60.
- Fabre T., Fayollas M., Richoilley G., Lecal J. 1969. Ultrastructure des quelques echinoderms. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*. 105 : 234—262.
- Fontaine A. R., Lambert P. 1975. The fine structure of the leucocytes of the holothurian *Cucumaria miniata*. *Can. J. Zool.* 55 : 1530—1544.
- Jangoux M., Vanden Bossche J. P. 1975. Morphologie et dynamique des coelomocytes d'*Asterias rubens* L. (Echinodermata, Asteroidea). *Forma et functio*. 8 : 191—208.
- Johnson P. T. 1969. The coelomic elements of sea urchin (*Strongylocentrotus*) 1. The normal coelomocytes, their morphology and dynamic in hanging drops. *J. Invert. Pathol.* 13 : 25—41.
- Kanungo K. 1982. *In vitro* studies on the effect of cell-free coelomic fluid, calcium and/on magnesium on clumping of coelomocytes of sea star *Asterias forbesi* (Echinodermata, Asteroidea). *Biol. Bull.* 163—438—452.
- Kanungo K. 1984. The coelomocytes of asteroid echinoderms. *Comp. Pathobiol.* 6 : 7—39.
- Karp R. D., Coffaro K. A. 1982. Cellular defense systems of the Echinodermata. In: *The reticuloendothelial system*. New York: Plenum Press. 3 : 257—282.
- Ohuye T. 1936. On the coelomic corpuscles in the body fluid of some invertebrates 5. Reaction of the coelomic corpuscles of a holothuroid *Molpadia roretzii* with reference of *Caudina chilensis*. *Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ. Biol.* 11 : 207—222.
- Thorndyke M. C., Chen W. C., Beeseley P. W., Patruno M. 2001a. Molecular approach to Echinoderm regeneration. *Micr. Res. Technique*. 55 : 474—485.
- Thorndyke M. C., Patruno M., Chen W. C., Beeseley P. W. 2001b. Stem cells regeneration in invertebrate Deuterostomes. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 53 : 107—120.
- Vanden Bossche J. P., Jangoux M. 1976. Epithelial origin of starfish coelomocytes. *Nature*. 261 : 227—228.

Поступила 22 VI 2005

THE ANALYSIS OF CELLULAR ELEMENTS IN COELOMIC FLUID OF THE STARFISH
ASTERIAS RUBENS L. IN EARLY REGENERATION TIME

A. B. Kozlova, O. A. Petukhova, G. P. Pinaev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg

Three main cell types were found in the coelomic fluid (CF) of intact starfishes: agranulocytes (55—80 %) varying in size and form (spherical and ovoid) and with occasional pseudopodia, granulocytes (15—45 %), and small cells (up to 2 %) with a high nuclear-cytoplasmic ratio. The starfish response to injury depends on the degree of coelomic fluid loss. After a slight wounding, when only insignificant portion of CF is lost, the cellular composition of circulating fluid changed only slightly. Unlike, a significant injury resulted in rising the share of small cells, regarded presumably as young cells. Besides, after injury the functional characteristics of SF also changed: the proportion of cells with decondensed chromatin and stained nucleoli increased, and coelomocytes acquired ability to form nets at adhesion. Moreover, some new cell types can be found (fusiform cells), with granulocyte proportion in nets increasing. We suppose that after slight wounding circulating coelomocytes may restore from the existing store of differentiated cells beyond the circulation, whereas after significant injury young undifferentiated coelomocytes are involved in the process of restoration.

Key words: *Asterias rubens*, coelomocytes, agranulocytes, granulocytes, small cell, regeneration.