

УЛЬТРАСТРУКТУРА ЦЕЛОМИЧЕСКОГО ЭПИТЕЛИЯ И ЦЕЛОМОЦИТОВ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS* L. В НОРМЕ И ПОСЛЕ НАНЕСЕНИЯ РАНЫ

© А. Н. Гориков,¹ М. И. Блинова, Г. П. Пинаев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

¹электронный адрес: angorsh@yahoo.com

С помощью электронной микроскопии исследованы образцы целомического эпителия (ЦЭ) и суспензии целомоцитов интактных и пораненных морских звезд *Asterias rubens* L. Установлено, что ЦЭ состоит из трех типов клеток: жгутиковых (около 60 %), секреторных (около 3 %) и миоэпителиальных (около 37 %). Жгутиковые и секреторные клетки формируют апикальную поверхность ЦЭ. Секреторные клетки представлены двумя подтипами — гранулярными и слизистыми клетками. Миоэпителиальные клетки расположены в базальной области эпителия. В 4—5 % случаев соседние жгутиковые клетки разделены межклеточными щелями различного размера. Эти щели, очевидно, представляют собой лакуны, оставшиеся после выхода жгутиковых клеток в целомическую полость. Охарактеризована морфологическая картина превращения жгутиковых клеток ЦЭ в целомоциты. После небольшого поранения, использованного в настоящем исследовании, не выявлено значительных структурных изменений в организации ЦЭ. В суспензии целомоцитов обнаружены небольшие округлые молодые целомоциты (около 3 %) и более крупные зрелые целомоциты (около 97 %). На поверхности одного из молодых целомоцитов обнаружен жгутик. Поверхность зрелых целомоцитов формирует отростки различной длины и структуры, а их цитоплазма содержит лизосомы и фагоцитарные вакуоли разного размера. После поранения отмечена активация целомоцитов, состоящая в резком увеличении количества и длины филоподий на их поверхности и в формировании ими многоклеточных агрегатов. Совокупность ультраструктурных данных позволяет предположить гистогенетическое происхождение целомоцитов из жгутиковых клеток ЦЭ как процесс клеточной трансдифференцировки.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Asterias rubens*, целомический эпителий, целомоциты, регенерация.

Представители типа иглокожих привлекают к себе устойчивое внимание клеточных и молекулярных биологов в течение нескольких последних десятилетий. Этот интерес в большой мере связан с высоким регенеративным потенциалом данных организмов. Значительная способность к восстановлению утраченных частей тела делает иглокожих ценными модельными объектами для изучения клеточных основ регенерации, поиска биологически активных молекул — регуляторов регенеративных процессов, а также для сравнительного анализа эволюционного многообразия феномена регенерации (см. обзоры: Долматов, 1999; Candia Carnevali, Bonasoro, 2001; Thorn-dyke et al., 2001; Candia Carnevali, 2006).

Хорошо известно, что исключительно важную роль в регенеративных процессах у различных иглокожих играют свободноживущие клетки целомической жидкости — целомоциты. При повреждениях тела иглокожих целомоциты выполняют по меньшей мере тройственную функцию. Во-первых, они быстро агрегируют в поврежденном участке стенки тела, восстанавливая тем самым изоляцию внутренней среды организма от внешней среды (Davidson, 1953; Smith, 1981; Candia Carnevali et al., 1993; Moss et al., 1998). Во-вторых, в ходе регенерации функцией целомоцитов является фагоцитоз клеточного дебриса и микроорганизмов, проникающих во внутреннюю среду орга-

низма в области раны (Heatfield, Travis, 1975; Mladenov et al., 1989; Matranga, 1996). В-третьих, целомоциты осуществляют синтез множества биологически активных веществ, имеющих защитное и регуляторное значение. К числу факторов, синтезируемых целомоцитами иглокожих, относятся белок теплового шока HSP70 (Patruno et al., 2001; Pinsino et al., 2007; Holm et al., 2008b), оксид азота (Beck et al., 2001), компоненты фенолоксидазной защитной системы (Smith, Söderhäll, 1991; Johansson, Soderhall, 1996), активные формы кислорода (Coteur et al., 2002), факторы-гомологи системы комплемента (Smith et al., 1996, 2001), лектины (Giga et al., 1987; Kakiuchi et al., 2002), а также белки, регулирующие клеточную пролиферацию и миграцию (Воронкина и др., 2001, 2003).

Система целомоцитов иглокожих в целом рассматривается как примитивная система врожденного иммунитета, вероятно имеющая некоторую степень гомологии с иммунной системой позвоночных, учитывая филогенетическое родство данных групп организмов (см. обзоры: Smith, 1991; Smith, Davidson, 1994; Кудрявцев, Полевщикова, 2004).

При всей очевидной важности целомоцитов иглокожих для понимания как эволюционных основ иммунитета, так и фундаментальных механизмов регенеративных процессов, структурная организация этих клеток и их ти-

пология до настоящего времени во многих отношениях не выяснены. В литературе опубликованы различные, зачастую противоречивые, данные (Booolootain, Guise, 1958; Hetzel, 1963; Fontaine, Lambert, 1975; Kaneshiro, Karp, 1980; Коренбаум, 1989; Edds, 1993; Козлова и др., 2006; Pinsino et al., 2007). Из анализа этих данных совершенно ясно, что, во-первых, в разных классах иглокожих система свободноживущих целомоцитов организована несколько по-разному. Во-вторых, описания структуры целомоцитов и их классификация, предлагаемая разными авторами, значительно зависят от методических особенностей работы (оптический или электронно-микроскопический уровень исследования, выбранный метод фиксации, изучение клеток в прикрепленном состоянии или в клеточной суспензии и т. д.).

В самом общем виде целомоциты иглокожих подразделяются на сферические клетки с гранулами (называемые разными авторами гранулоцитами, морулярными клетками, элеоцитами, клетками-сферулами) и амебодные клетки (амебоциты, фагоциты — по терминологии различных авторов). Каждая из этих двух групп клеток дополнительно подразделяется на подгруппы; эта классификация варьирует в разных классах иглокожих и в описаниях разных авторов. В дополнение к этим основным типам клеток в составе целомоцитов описаны немногочисленные мелкие округлые клетки и клетки со жгутиком (см. обзоры: Исаева, Коренбаум, 1989; Кудрявцев, Полевщиков, 2004; Pinsino et al., 2007). Предложена также альтернативная классификация целомоцитов, основанная на структурных особенностях их адгезии к субстрату и организации цитоскелета (Edds, 1984, 1993). Таким образом, общепринятой классификации целомоцитов иглокожих (подобной классификации клеток крови позвоночных) в настоящее время не существует.

Аналогичным образом не выяснен вопрос гистогенеза целомоцитов. Уже в ранних публикациях были выдвинуты две альтернативные точки зрения на механизм поддержания численности популяции клеток целомической жидкости: деление свободноживущих целомоцитов (или их недифференцированных предшественников) в целомической жидкости (Holland et al., 1965) или рекрутирование целомоцитов из состава оседлых клеток определенных органов тела животного.

Из работ по регенерации иглокожих хорошо известно, что после поранения животного и потери значительного объема целомической жидкости с содержащимися в ней клетками численность целомоцитов в целомической полости быстро (в течение 1—2 сут или меньше) восстанавливается до первоначальной величины или даже превышает ее (Schinke, 1950; Vanden Bossche, Jangoux, 1976; Козлова и др., 2006; Pinsino et al., 2007; Holm et al., 2008b). Столь стремительное восстановление клеточной популяции целомоцитов не может быть достигнуто исключительно за счет их митотического деления. Поэтому хотя данные автордиографического исследования говорят об определенном уровне митотической активности целомоцитов (Holland et al., 1965) и деление свободноживущих клеток, возможно, вносит некий вклад в поддержание их численности, тем не менее преобладающим механизмом пополнения клеточной популяции должен являться выход целомоцитов из органов-депо.

В качестве таких депо свободноживущих целомоцитов или их предшественников разными авторами рассматривались тидемановы тельца (Bargmann, Behrens, 1964; Paracer, 1967), аксиальный орган (Bargmann, Nehn, 1968;

Millot, 1969), тязи мезенхимных клеток в соединительной ткани и гемальных сосудах (Schinke, 1950; Hetzel, 1965), целомический эпителий (ЦЭ; Burton, 1966; Vethamany, Fang, 1972). Первоначально эти предположения были сделаны авторами главным образом на основании обнаружения целомоцитов на гистологических срезах перечисленных органов. Однако присутствие целомоцитов в составе органа не обязательно означает, что орган является их гистогенетическим источником. В частности, в исследованиях Фергюсона (Ferguson, 1966, 1984) была выдвинута гипотеза о преимущественно экскреторной и фильтрационной (а не гемопоэтической) функции аксиального органа и тидемановых телец, с чем и связана, по его мнению, аккумуляция наполненных фагоцитированными частицами целомоцитов в этих органах. Вместе с тем в литературе имеются недавно опубликованные данные о присутствии регулярно пролиферирующих клеток в составе тидемановых телец, аксиального органа и ЦЭ, причем уровень их пролиферации может быть значительно увеличен воздействием различными митогенными веществами (Holm et al., 2008a). Согласно этим данным, все вышеперечисленные органы являются кандидатами на роль гемопоэтической ткани иглокожих.

Аксиальный орган морских звезд неоднократно изучался; в его составе были обнаружены способные к делению Т- и В-лимфоцитоподобные клетки (Leclerc et al., 1993). Подобно лимфоцитам позвоночных, эти клетки могут связывать антиген и синтезировать иммуноглобулин-подобные белки (Delmotte et al., 1986; Leclerc, 2000). Лимфоцитоподобные клетки аксиального органа осуществляют также синтез примитивных IL-1-подобных цитокинов и цитокиновых рецепторов (Beck, Nabicht, 1986; Legac et al., 1996). Необходимо отметить, что эта серия исследований при всей ее очевидной важности и новизне оставляет совершенно открытым вопрос о гистогенетических и функциональных отношениях Т- и В-лимфоцитоподобных клеток аксиального органа с остальными свободноживущими целомоцитами.

Идея о функционировании ЦЭ в качестве ткани-резервуара свободноживущих целомоцитов получила дальнейшие экспериментальные подтверждения в работах с использованием ферритиновой и иммунной меток. В обоих случаях было установлено, что ферритин, введенный в целомическую полость (Vanden Bossche, Jangoux, 1976), и моноклональные антитела BEVIB12b8 (Pinsino et al., 2007) специфически метят целомоциты и клетки ЦЭ морских звезд, тем самым демонстрируя их гистогенетическое родство. При введении ферритиновой метки и последующем экспериментальном истощении пула целомоцитов вновь образующиеся целомоциты содержали ферритин в своей цитоплазме, что послужило дополнительным аргументом в пользу их происхождения из клеток ЦЭ (Vanden Bossche, Jangoux, 1976). В литературе имеются также данные конфокальной микроскопии о значительном морфологическом сходстве свободноживущих целомоцитов и клеток ЦЭ (Holm et al., 2008a).

Таким образом, проблема гистогенеза свободноживущих целомоцитов до настоящего времени не разрешена, несмотря на ряд адресованных ей цитированных выше исследований. По совокупности опубликованных данных, наиболее экспериментально обоснованной представляется гипотеза о происхождении целомоцитов из оседлых клеток ЦЭ. Возможно также, что целомоциты с разными морфофункциональными характеристиками происходят из разных органов тела иглокожих.

В связи с вышесказанным в настоящей работе мы выполнили электронно-микроскопический анализ суспензии свободноживущих целомочитов и ЦЭ (как их вероятного гистогенетического предшественника) морской звезды *Asterias rubens* в норме и в условиях экспериментального поранения стенки тела. Целью работы являлись получение информации об ультраструктуре ЦЭ и целомочитов в норме, проверка предположения о гистогенетическом родстве целомочического эпителия и целомочитов с помощью данных электронной микроскопии и исследование реакции двух данных тканевых систем на нанесение раны.

Материал и методика

Морские звезды *Asterias rubens* были собраны во время экспедиций в августе—сентябре 2006 и 2007 гг. в Чупинской губе Кандалакшского залива Белого моря, на Беломорской биостанции Зоологического института РАН (мыс Каргеш). Животные были собраны с глубины 2—8 м; для исследований выбирали крупных звезд диаметром 10—15 см. В ходе экспериментов животных содержали в ваннах с аэрируемой морской водой при температуре около 10 °С.

Поранение животных осуществляли скальпелем в виде надреза стенки тела в одном из лучей, длина раны составляла около 1 см. Стенку тела повреждали на всю ее толщину, до целомочической полости. После нанесения раны животных помещали в морскую воду. Образцы ЦЭ и целомочитов пораненных морских звезд были зафиксированы через 5 ч после поранения, поскольку в предыдущих исследованиях у животных с ампутированным лучом на этом сроке были обнаружены существенные изменения белкового и клеточного состава целомочической жидкости (Воронкина и др., 2001; Козлова и др., 2006).

Кусочки целомочического эпителия небольшого размера были выделены из одного из лучей. С целью изучения реакции на поранение ЦЭ как целостной тканевой системы у пораненных животных образцы были получены из неповрежденного луча, соседнего с пораненным. Префиксация материала была проведена в 2.5%-ном растворе глутаральдегида в свободной от кальция и магния искусственной морской воде CMFSS (calcium- and magnesium-free salt solution) — 0.5 M NaCl, 0.0026 M KCl, 0.1 M Трис, pH 8.0 (Kanungo, 1982) — в течение 30 мин. После этого объекты были трехкратно промыты CMFSS и постфиксированы 1%-ным раствором OsO₄ в CMFSS в течение 1 ч. Затем кусочки были дегидратированы в серии растворов этанола возрастающей концентрации и заключены в эпоксидную смолу Аралдит.

Суспензия целомочитов интактных и пораненных морских звезд была получена путем отрезания кончика одного из лучей и последующего сбора вытекающей целомочической жидкости. Для предотвращения агрегации клеток в пробах целомочической жидкости и сохранения целомочитов в нативном состоянии собранная целомочическая жидкость была смешана с равным объемом CMFSS, содержащего 15 мМ ЭДТА (Kanungo, 1982). После этого целомочическая жидкость с содержащимися в ней клетками была немедленно отцентрифугирована на скорости 1500 об/мин; к полученному таким образом осадку клеточных элементов был добавлен на 30 мин 2.5%-ный раствор глутаральдегида в CMFSS, в котором клетки были ресуспендированы. После этого были выполнены

тремякратная промывка клеток в CMFSS, их постфиксация 1%-ным раствором OsO₄ в CMFSS в течение 1 ч, дегидратация в серии растворов этанола возрастающей концентрации и заключение в смолу Аралдит. В ходе проведения вышеперечисленных процедур при каждой смене раствора клетки были осаждены центрифугированием и затем ресуспендированы в новом растворе.

Для электронно-микроскопического анализа залитые в эпоксидную смолу кусочки ЦЭ и суспензия целомочитов интактных и пораненных морских звезд были нарезаны на ультрамикротоме LKB. Полученные полутонкие срезы ЦЭ толщиной 1—2 мкм были окрашены толуидиновым синим и изучены в оптическом микроскопе Axioscope Zeiss, снабженном CCD-фотокамерой. Ультратонкие срезы исследуемых образцов толщиной до 80 нм были собраны на сетки с коллодиевой подложкой, после чего сетки со срезами были отконтрастированы в уранил-ацетате и цитрате свинца и исследованы в электронном микроскопе JEM 100U. Для получения электронных микрофотографий была использована фотопленка Camera 2000 (Kodak).

Цифровые изображения препаратов были отредактированы с помощью программы Adobe Photoshop CS2 таким образом, чтобы при этом не исказить содержащуюся в них биологическую информацию.

Результаты

Ультраструктура целомочического эпителия. Целомочический эпителий (ЦЭ) *A. rubens* отделяет просвет целомочической полости от остальных органов и тканей тела животного. По данным анализа полутонких срезов в световом микроскопе, ЦЭ представляет собой многоярядный эпителий толщиной около 20—30 мкм; ядра входящих в его состав клеток формируют 4—5 неравномерных слоев (рис. 1, а). В изучаемых образцах совместно с ЦЭ были выделены и зафиксированы подстилающий его слой соединительной ткани и пучки мышечных волокон. При максимальном увеличении оптического микроскопа удается выявить большинство типов клеток, входящих в состав ЦЭ, — апикально расположенные жгутиковые клетки, секреторные гранулярные клетки с многочисленными гранулами в цитоплазме, интенсивно окрашивающимися толуидиновым синим, и базально залегающие группы веретенновидных миоэпителиальных клеток. Кроме того, преимущественно в складках эпителиального слоя выявляются прикрепившиеся к апикальной поверхности эпителия целомочиты из целомочической жидкости (рис. 1, б).

Более детальная информация о тонкой организации ЦЭ была получена с помощью электронной микроскопии. Электронно-микроскопический анализ подтвердил, что ЦЭ состоит из нескольких типов клеток. Наиболее апикальное положение в составе эпителиального слоя занимают жгутиковые клетки. На долю клеток данного типа приходится около 60 % от всех клеток, входящих в состав эпителия. Жгутиковые клетки, как правило, имеют призматическую или близкую к кубической форму, их высота составляет около 10 мкм (рис. 2, а). Отличительной особенностью клеток указанного типа является присутствие на их апикальной поверхности одного жгутика с характерным набором микротрубочек (9 + 2) в его составе (рис. 2, б). Помимо жгутика на апикальной поверхности данных клеток имеются микроворсинки. На срезах, па-

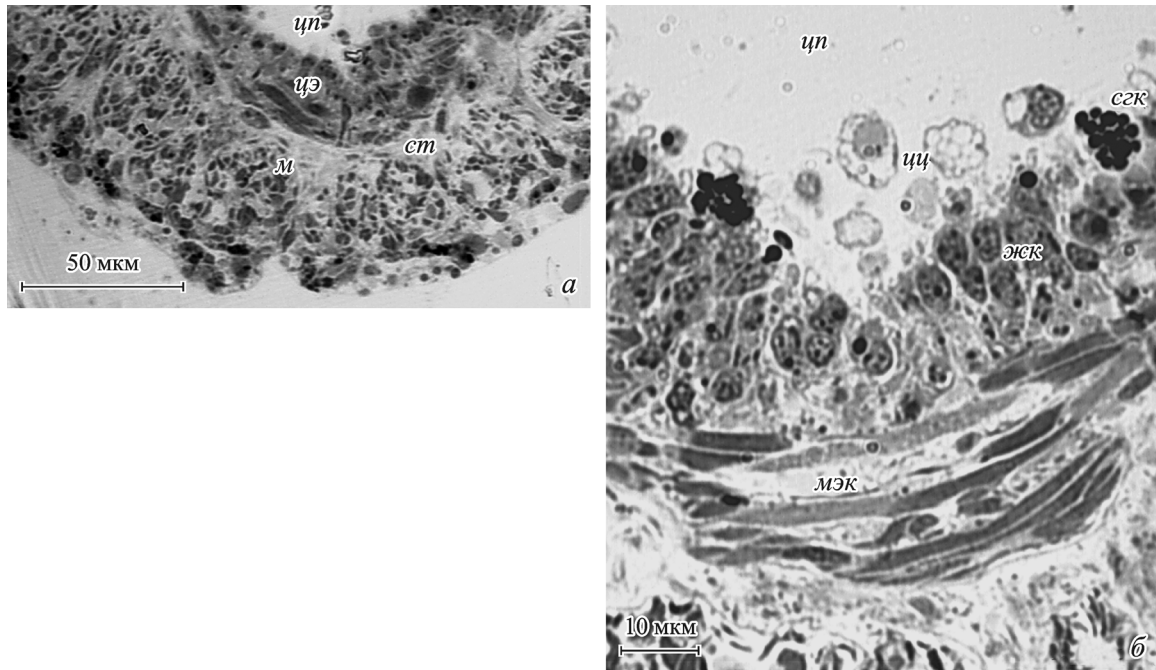


Рис. 1. Организация целомического эпителия *Asterias rubens* по данным световой микроскопии (полутонкие срезы). *а* — увеличение об. 40×, видны многорядная структура эпителия и подстилающие эпителий слои соединительной ткани и мышц; *б* — увеличение об. 100×, видны основные типы клеток в составе эпителия. *жк* — жгутиковые клетки, *м* — мышцы, *мэж* — миоэпителиальные клетки, *сгк* — секреторная гранулярная клетка, *ст* — соединительная ткань, *цп* — целомическая полость, *цц* — целомоциты, *цэ* — целомический эпителий.

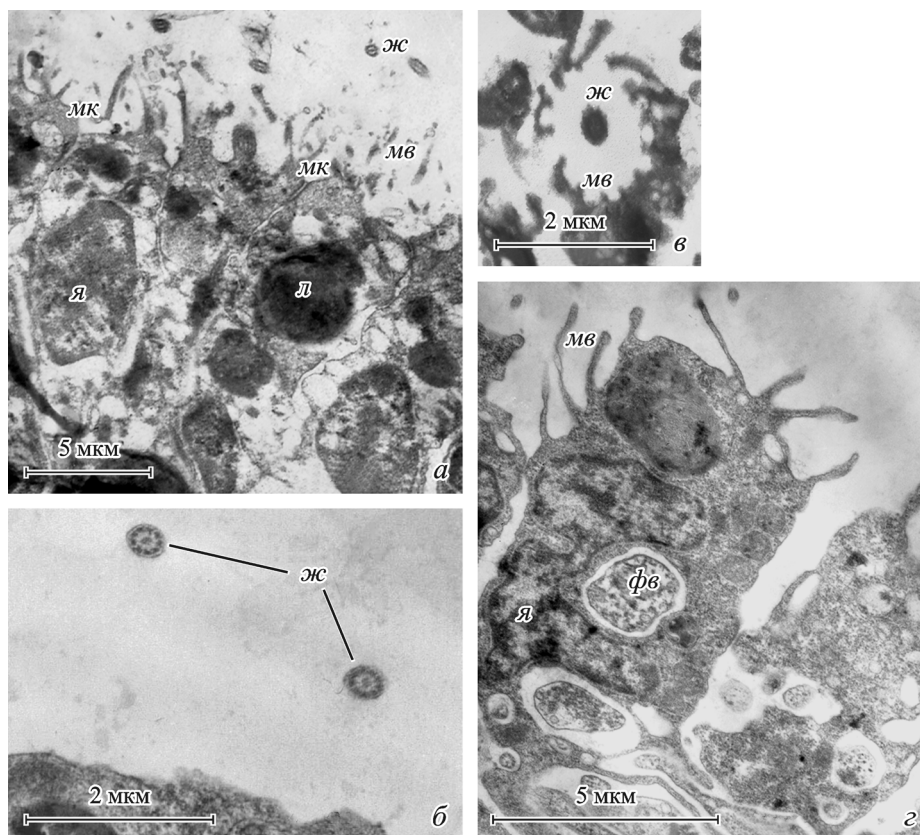


Рис. 2. Ультраструктура жгутиковых клеток.

а — общий вид жгутиковых клеток на продольном срезе; *б* — поперечный срез жгутика, виден набор микротрубочек 9 + 2; *в* — поперечный срез жгутиковой клетки вблизи от апикальной поверхности, видно кольцо микроворсинок, окружающее базальную часть жгутика; *г* — фагоцитарная вакуоль в цитоплазме жгутиковой клетки. *жс* — жгутики, *л* — лизосома, *мв* — микроворсинки, *мк* — межклеточные контакты, *фв* — фагоцитарная вакуоль, *я* — ядро жгутиковой клетки.

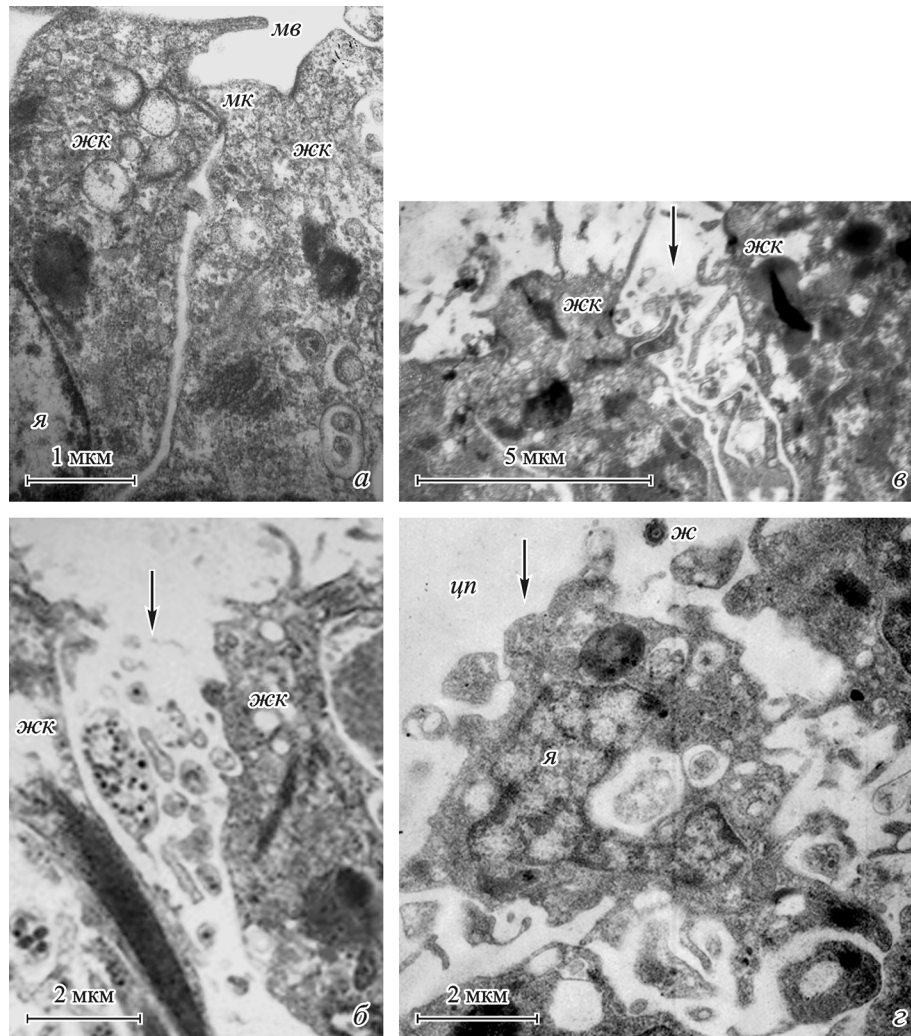


Рис. 3. Межклеточные контакты и подвижность жгутиковых клеток.

а — межклеточный контакт между двумя жгутиковыми клетками; *б, в* — межклеточные щели между жгутиковыми клетками, *стрелки* — межклеточные щели; *г* — выход жгутиковой клетки из эпителиального слоя в целомическую полость, *стрелка* — выходящая в целомическую полость жгутиковая клетка; остальные обозначения те же, что и на рис. 1, 2.

параллельных плоскости эпителия и прошедших через самую поверхностную зону клетки, видно, что жгутик окружен кольцом из 10—15 микроворсинок. Основания микроворсинок формируют небольшое углубление, в которое погружена базальная область жгутика (рис. 2, *в*). Еще одной характерной чертой ультраструктуры жгутиковых клеток является частое присутствие в их апикальной или перинуклеарной цитоплазме крупных лизосом и фагоцитарных вакуолей диаметром до 3 мкм с содержимым различной электронной плотности, что свидетельствует о хорошо выраженной фагоцитарной активности данных клеток (рис. 2, *а, г*).

Латеральные поверхности соседних жгутиковых клеток, как правило, соединены электронно-плотными межклеточными контактами (рис. 3, *а*). Однако необходимо отметить, что в 4—5 % случаев вместо сформированных межклеточных контактов между жгутиковыми клетками обнаруживаются открытые щели различного размера — от небольших до сопоставимых с размерами самих клеток (рис. 3, *б, в*). На наш взгляд, отсутствие сформированных межклеточных контактов между некоторыми из соседних жгутиковых клеток ЦЭ связано с выходом жгутиковых

клеток в этих участках из состава ЦЭ в целомическую полость и их превращением в свободные целомоциты. В отдельных случаях нам удалось обнаружить жгутиковые клетки, зафиксированные незадолго до их высвобождения из состава эпителиального пласта. Такие клетки приобретают выраженную коническую форму с расширенным телом клетки, выдвинутым в просвет целомической полости, и резко сужающимся базальным отростком (рис. 3, *г*). В составе эпителиального слоя данные клетки удерживаются несколькими тонкими пальцевидными выростами на их базолатеральной поверхности, контактирующими с аналогичными отростками соседних клеток. Очевидно, такая морфологическая картина характеризует этап, непосредственно предшествующий окончательному выходу описываемых клеток из состава ЦЭ и появлению межклеточной щели в этом участке.

Вторым типом клеток в составе ЦЭ являются секреторные клетки. Как и жгутиковые клетки, секреторные клетки локализованы в апикальной области эпителия, однако на их долю приходится всего около 2—3 % от общего числа эпителиальных клеток. Секреторные клетки ЦЭ подразделяются на 2 подтипа, резко различающихся по

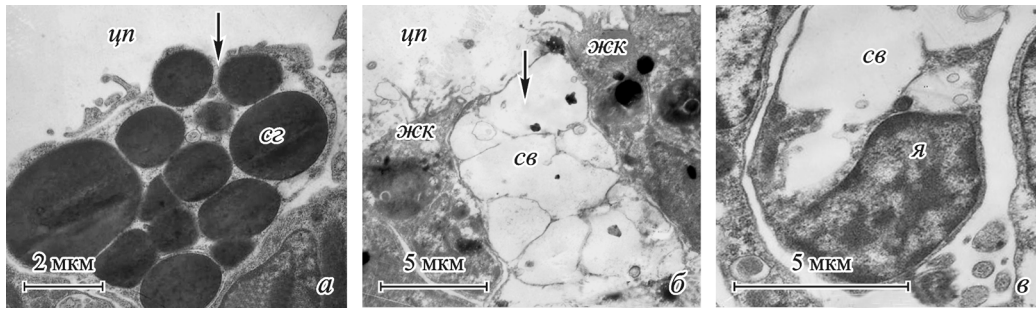


Рис. 4. Ультраструктура секреторных клеток.

a — секреторная гранулярная клетка (стрелка); *b* — секреторная слизистая клетка (стрелка); *в* — ядросодержащая базальная область секреторной слизистой клетки. *св* — секреторные вакуоли, *сг* — секреторные гранулы, *я* — ядро секреторной слизистой клетки; остальные обозначения те же, что и на рис. 1, 2.

структуре и, очевидно, по составу секретируемых в целомическую полость веществ.

Первый подтип секреторных клеток — секреторные гранулярные клетки. Данные клетки легко идентифицируются как в оптическом микроскопе при анализе полутонких срезов (рис. 1, *b*), так и в электронном микроскопе (рис. 4, *a*). Это клетки несколько более округлой формы, чем жгутиковые клетки. Их цитоплазма заполнена крупными округлыми гранулами диаметром до 4 мкм. Гранулы интенсивно включают толуидиновый синий при окрашке им полутонких срезов (рис. 1, *b*) и являются электронно-плотными при электронно-микроскопическом анализе (рис. 4, *a*).

Цитоплазма второго подтипа секреторных клеток заполнена несколькими очень крупными (до 5—6 мкм в диаметре) вакуолями с электронно-прозрачным содержимым (рис. 4, *b*). Относительно небольшое ядро данных клеток отнесено на их периферию и занимает базальное положение (рис. 4, *в*). Ультраструктура указанных клеток совпадает с хорошо известной организацией слизистых клеток различных эпителиев; на этом основании мы считаем описываемые клетки секреторными слизистыми клетками.

В базальной части ЦЭ непосредственно над базальной мембраной, отделяющей ЦЭ от слоя соединительной ткани, располагаются группы миоэпителиальных клеток, на долю которых приходится чуть меньше 40 % от общего количества клеток ЦЭ. В составе эпителия миоэпителиальные клетки формируют слой варьирующей толщины, подстилающий слой жгутиковых клеток. Клетки указанного типа имеют вытянутую палочковидную или веретеновидную форму, их длина составляет 10—20 мкм (рис. 1, *b*; 5, *a*).

Основной объем цитоплазмы миоэпителиальных клеток заполнен многочисленными миофибриллами (рис. 5, *b*). При больших увеличениях прослеживаются периодически повторяющиеся электронно-плотные зоны в составе миофибрилл — аналогично хорошо известным «плотным телам» миофибрилл гладкомышечных клеток и «плотным регионам» стресс-фибрилл клеток в культуре (рис. 5, *в*).

По нашим наблюдениям, миофибриллы в разных миоэпителиальных клетках могут находиться в различном функциональном состоянии — сокращенном и несокращенном. Клетки с несокращенными миофибриллами имеют более удлиненную форму, а ориентация миофибрилл в них практически параллельна длинной оси клетки. Клетки с сокращенными миофибриллами характеризуются

более короткой и утолщенной, приближающейся к овальной, формой. Ориентация миофибрилл в таких клетках не имеет столь выраженной упорядоченности, большинство миофибрилл пересекаются друг с другом под различными углами (рис. 5, *b*).

Некрупная ядросодержащая часть цитоплазмы миоэпителиальных клеток не содержит миофибрилл и формирует утолщение на периферии тела клетки (рис. 5, *з*). Помимо перикариона на поверхности миоэпителиальных клеток имеется несколько небольших периферических отростков, также свободных от миофибрилл (рис. 5, *a*).

В дополнение к вышеперечисленным типам клеточных элементов между клетками ЦЭ часто присутствуют отростки нервных клеток, заполненные большим количеством мелких электронно-плотных нейросекреторных гранул диаметром около 100 нм (рис. 6). Отростки обнаруживаются как в апикальной части ЦЭ, между латеральными поверхностями жгутиковых клеток (рис. 6, *a*), так и в его базальной области, между миоэпителиальными клетками (рис. 6, *b*). Хотя данные отростки в ряде случаев достаточно тесно прилежат к эпителиальным клеткам, мы не обнаружили специализированных синаптических контактов в составе целомического эпителия.

С целью изучения реакции ЦЭ как единой тканевой системы на поранение, исходя из гипотезы о возможном происхождении целомоцитов из жгутиковых клеток целомического эпителия, мы выполнили электронно-микроскопический анализ ЦЭ *A. rubens* в условиях нанесения раны. Образцы ЦЭ для этого исследования были взяты из неповрежденного, соседнего с пораненным луча. Проведенное таким образом электронно-микроскопическое исследование не выявило каких-либо перемен в структурной организации эпителия. Основные морфологические параметры — качественный и количественный клеточный состав, характерные черты тонкой структуры эпителиальных клеток, организация системы межклеточных контактов — не претерпевают заметных изменений (данные не показаны). Таким образом, при использованном в наших экспериментах относительно небольшом повреждении стенки тела животного (продольный надрез одного луча длиной около 1 см) ЦЭ неповрежденных участков, пространственно удаленных от области раны, не реагирует на поранение, а регенеративные процессы в области раны, очевидно, происходят за счет уже имеющегося в наличии на момент поранения пула свободных целомоцитов.

Ультраструктура целомоцитов интактных морских звезд. По результатам электронно-мик-

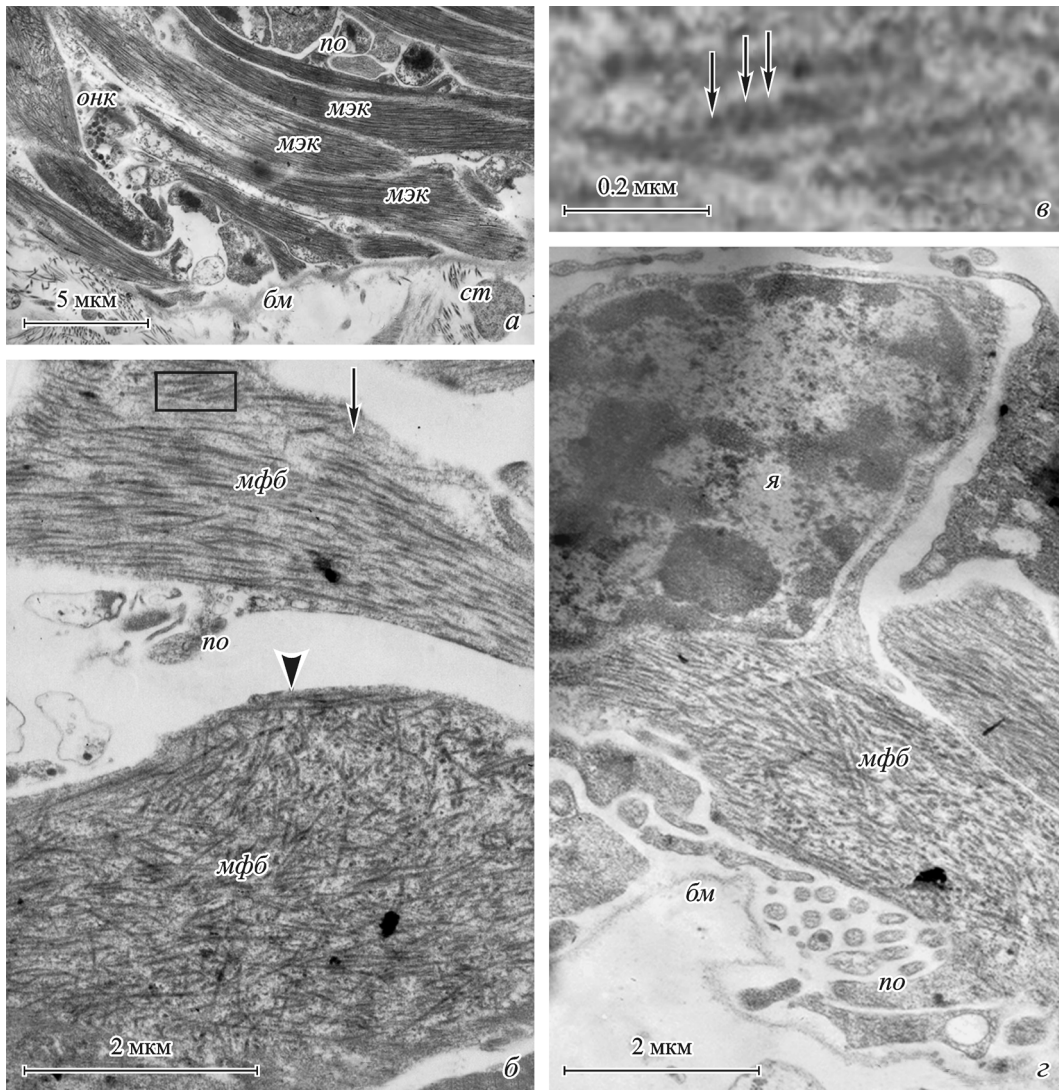


Рис. 5. Ультраструктура миоэпителиальных клеток.

a — общий вид миоэпителиальных клеток; *б* — миофибриллы в цитоплазме миоэпителиальных клеток, *стрелка* — клетка с несокращенными миофибриллами, *голова стрелки* — клетка с сокращенными миофибриллами; *в* — увеличенное изображение выделенного на рис. 5, *б* фрагмента, видны периодически повторяющиеся электронно-плотные зоны в составе миофибрилл (*стрелки*); *г* — ядродержащая область миоэпителиальной клетки. *бл* — базальная мембрана, *мфб* — миофибриллы, *мэж* — миоэпителиальные клетки, *онк* — отросток нервной клетки, *по* — периферический отросток миоэпителиальной клетки, *ст* — соединительная ткань, *я* — ядро миоэпителиальной клетки.

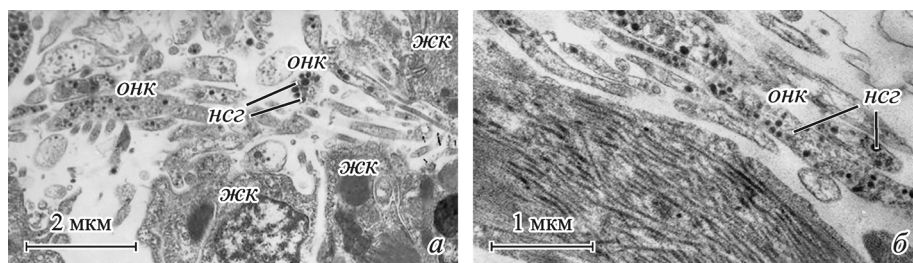


Рис. 6. Отростки нервных клеток в целомическом эпителии.

a — отростки нервных клеток между латеральными поверхностями жгутиковых клеток (поперечный срез ЦЭ на уровне ядер жгутиковых клеток); *б* — отростки нервных клеток между миоэпителиальными клетками. *нсг* — нейросекреторные гранулы, *онк* — отростки нервных клеток; остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

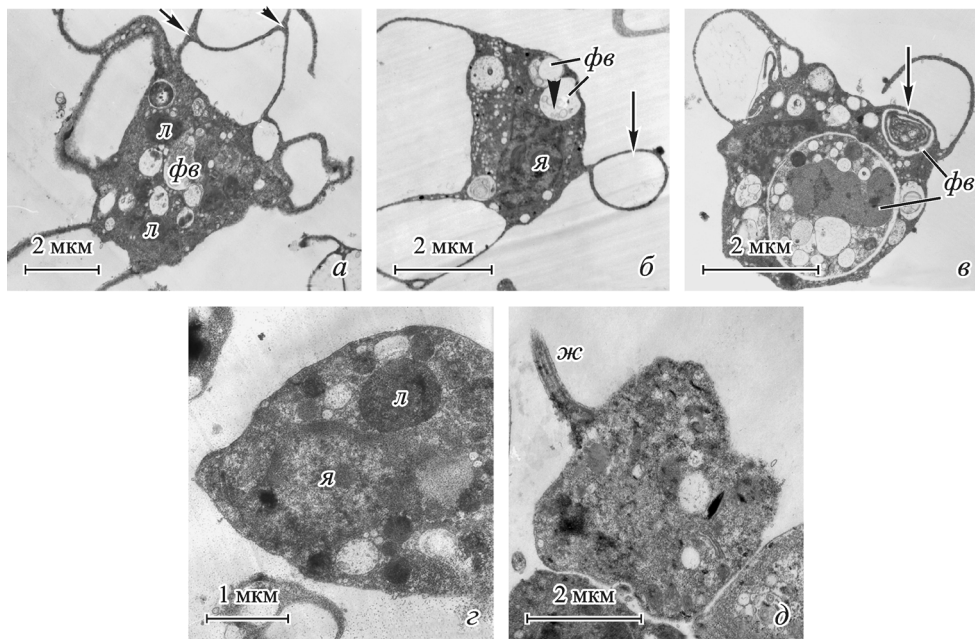


Рис. 7. Ультраструктура целомоцитов в норме.

a–в — зрелые целомоциты; *z, d* — молодые целомоциты; *a* — зрелый целомоцит, несущий анастомозирующие отростки на поверхности (*стрелки*); *б* — зрелый целомоцит, несущий петлеобразный отросток на поверхности (*стрелка*) и содержащий фагоцитарную вакуоль с везикулярным содержимым (*головка стрелки*); *в* — зрелый целомоцит, содержащий очень крупную фагоцитарную вакуоль, а также небольшую вакуоль с ламеллярным содержимым (*стрелка*); *z* — молодой целомоцит, содержащий лизосому; *d* — молодой целомоцит, несущий жгутик на своей поверхности. *я* — ядра целомоцитов; остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

роскопического анализа, суспензия клеток целомической жидкости состоит из одиночных клеток, не ассоциированных друг с другом. В популяции свободных целомоцитов целомической жидкости мы выявили клетки двух типов, являющиеся, по нашему мнению, зрелыми и незрелыми (молодыми) целомоцитами.

Зрелые целомоциты составляют абсолютное большинство (97–98 %) от всей клеточной популяции. Данные клетки имеют округлую или слегка удлинённую ядродержащую область диаметром 4–5 мкм и несколько отходящих от нее тонких отростков; их длина, наблюдаемая в плоскости среза, составляет 3–6 мкм (рис. 7, *a–в*). Количество и организация системы отростков зрелых целомоцитов могут различаться в клетках данного типа; в

среднем в плоскости ультратонкого среза оказываются 3–4 отростка, отходящих от тела целомоцита. В зрелых целомоцитах встречаются как пальцевидные филоподиальные отростки, так и более сложные образования в виде анастомозирующих отростков (рис. 7, *a*) или замкнутых «петлеобразных» структур (рис. 7, *б*).

Основной особенностью центральной ядродержащей области зрелых целомоцитов является присутствие большого количества лизосом и фагоцитарных вакуолей в их цитоплазме. Первичные лизосомы имеют гомогенное содержимое и высокую электронную плотность (рис. 7, *a*). Фагоцитарные вакуоли и вторичные лизосомы (фаголизосомы), как правило, имеют меньшую электронную плотность, чем первичные лизосомы, а структура содер-

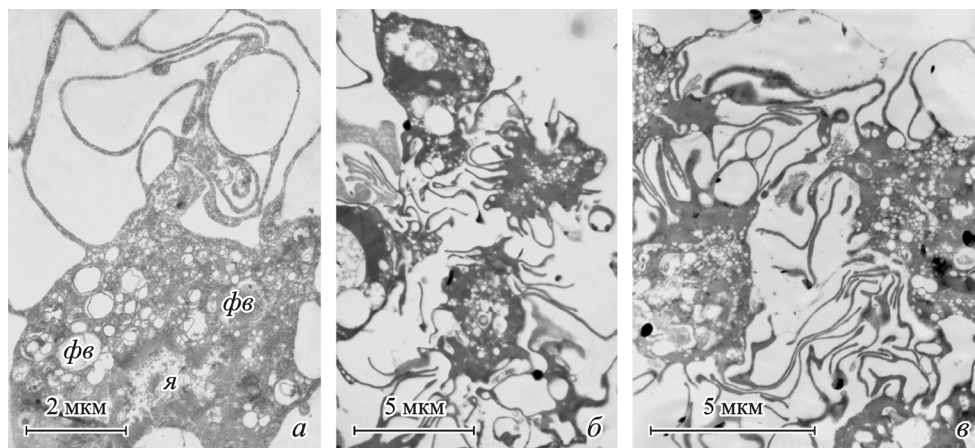


Рис. 8. Ультраструктура зрелых целомоцитов в условиях поранения.

a — увеличение количества и длины отростков на поверхности клетки (ср. с рис. 7, *a–в*); *б, в* — многоклеточные агрегаты зрелых целомоцитов; обозначения те же, что на рис. 2, 7.

жащегося в них материала широко варьирует. В их составе часто присутствуют везикулярные (рис. 7, б) или ламеллярные (рис. 7, в) мембранные включения. Преобладающий размер лизосом и фагоцитарных вакуолей составляет 0.5—1.0 мкм, однако в некоторых случаях в целомочитах обнаруживаются очень крупные вакуоли диаметром до 3 мкм, заполняющие большую часть объема цитоплазмы (рис. 7, в).

Доля незрелых (молодых) целомочитов составляет около 2—3 % от общего количества клеток целомочической жидкости. Форма молодых целомочитов близка к округлой или овальной. В среднем диаметр данных клеток несколько меньше, чем размер ядросодержащей области зрелых целомочитов (3—4 мкм). В отличие от зрелых целомочитов на поверхности молодых целомочитов не обнаруживаются филоподиальных отростков. В их цитоплазме могут присутствовать отдельные первичные лизосомы, но фагоцитарных вакуолей, в особенности крупных, не встречается (рис. 7, з). Таким образом, молодые целомочиты не имеют типичных морфологических признаков, характеризующих зрелые дифференцированные целомочиты.

Как уже было отмечено ранее, по нашему мнению, источником молодых целомочитов целомочической жидкости являются жгутиковые клетки ЦЭ, вышедшие из состава эпителиального слоя. В одном случае нам удалось получить прямое ультраструктурное подтверждение этого предположения — в составе суспензии клеток целомочической жидкости был обнаружен молодой целомочит, несущий жгутик на своей поверхности (рис. 7, д). В изучаемом нами материале жгутик является надежным морфологическим маркером жгутиковых клеток ЦЭ, поэтому присутствие данного органоида на поверхности свободного целомочита является аргументом в пользу гистогенетического родства тех и других.

Через 5 ч после нанесения раны в ультраструктуре зрелых целомочитов пораненных морских звезд были обнаружены существенные изменения. По сравнению с клетками интактных животных наблюдается резкое возрастание количества и длины отростков, образующих клеточной поверхностью зрелых целомочитов. В плоскости ультратонкого среза обнаруживаются в среднем 10—12 отростков, отходящих от ядросодержащей области целомочита (трехкратное увеличение по сравнению с контролем). Длина отростков, наблюдаемых в плоскости среза, варьирует от 5 до 15 мкм, часто встречаются анастомозирующие и петлеобразные отростки (рис. 8, а; ср. с рис. 7, а—в).

Еще одна особенность зрелых целомочитов пораненных животных состоит в том, что они формируют многоклеточные агрегаты, в которых клетки ассоциированы друг с другом с помощью вышеописанных отростков (рис. 8, б, в). На долю агрегированных целомочитов приходится около 80 % от общего количества клеток суспензии.

Фагоцитарная активность и организация фагоцитарных вакуолей зрелых целомочитов раненых животных, по нашим наблюдениям, не претерпевают существенных изменений по сравнению с нормальными условиями (рис. 8, а).

В ультраструктуре молодых целомочитов не происходит заметных изменений — это немногочисленные округлые клетки без явных морфологических признаков дифференцировки (данные не показаны). Как и у интактных животных, на долю молодых целомочитов приходится

около 2—3 % от общего количества клеток суспензии, в то время как на долю зрелых целомочитов — остальные 97—98 %.

Обсуждение

По совокупности литературных данных, ЦЭ является наиболее вероятным гистогенетическим предшественником свободноживущих целомочитов иглокожих (Pinsino et al., 2007). Для дальнейшей проверки этого предположения в настоящей работе мы выполнили электронно-микроскопическое исследование двух тканевых систем морской звезды *A. rubens* — ЦЭ и свободноживущих целомочитов.

ЦЭ морских звезд до настоящего времени не был самостоятельным объектом электронно-микроскопического анализа. Тем не менее, поскольку ЦЭ образует перивисцеральную выстилку всех органов тела иглокожих, имеются более или менее детальные описания его тонкой организации в нескольких публикациях, посвященных ультраструктуре различных органов (Bargmann, von Hehn, 1968; Cobb, 1978; Walker, 1979; Schoenmakers et al., 1981; Martinez et al., 1991). В нашей работе мы подтвердили данные этих исследований и продемонстрировали, что ЦЭ имеет неоднородный клеточный состав и состоит из трех различных типов клеток: жгутиковых (в литературе называемых также «воротничковыми»), секреторных, представленных двумя подтипами — гранулярными и слизистыми, и миоэпителиальных.

Жгутиковые клетки практически полностью формируют апикальную поверхность эпителиального слоя. Именно они, по мнению ряда исследователей (Vanden Bossche, Jangoux, 1976; Коренбаум, Воробьев, 1988; Коренбаум, 1989; Pinsino et al., 2007; Holm et al., 2008a), способны выходить из состава эпителиального слоя и превращаться в свободные целомочиты. В настоящем исследовании при ультраструктурном анализе ЦЭ мы получили дополнительные аргументы в пользу этого предположения. Мы отметили, что приблизительно в 5 % случаев соседние жгутиковые клетки не соединены межклеточными контактами, а разделены щелями различного размера. В литературе существует аналогичное наблюдение, сделанное на уровне оптической микроскопии (Bargmann, von Hehn, 1968); мы получили электронно-микроскопическое подтверждение этого факта. На наш взгляд, эти участки являются лакунами, образовавшимися после выхода жгутиковых клеток в целомочическую полость. В дополнение к вышесказанному в некоторых случаях на ультратонких срезах мы наблюдали жгутиковые клетки, зафиксированные незадолго до их высвобождения из эпителиального слоя, — тело таких клеток выдвинуто в просвет целомочической полости; в составе эпителия они удерживаются крайне немногочисленными тонкими отростками базальной цитоплазмы.

Проверяя гипотезу о происхождении целомочитов из жгутиковых клеток ЦЭ, мы попытались проследить изменения в клеточном составе и структурной организации образцов ЦЭ в условиях поранения. Исследование образцов ЦЭ мы осуществляли при относительно небольшом повреждении стенки тела животных (надрез стенки тела длиной около 1 см в одном из лучей), при этом кусочки ЦЭ были взяты из соседнего с пораненным лучом. Ультраструктурное исследование обнаружило, что в условиях нашего эксперимента изменений в организации ЦЭ не на-

блюдается. Этот результат согласуется с ранее опубликованными данными о том, что при таком «легком» поранении нет существенных изменений в клеточном составе целомоцитов (изменения были отмечены только при «тяжелом поранении», т. е. при ампутации луча) (Козлова и др., 2006).

Известно, что у пораненных морских звезд в целомической жидкости обнаруживаются белковые факторы, активирующие миграцию и пролиферацию клеток (Воронкина и др., 2001, 2003). По-видимому, именно эти факторы регулируют рекрутинг целомоцитов из состава ЦЭ. Очевидно, при легком поранении концентрация этих регуляторных молекул, секретируемых в целомическую жидкость, недостаточна для запуска массовой миграции клеток ЦЭ, так как в такой миграции нет необходимости — имеющегося пула целомоцитов вполне достаточно для успешного заживления небольшой раны. Возможно также, что действие вышеупомянутых факторов пространственно ограничено их диффузией по целомической жидкости и затрагивает только области ЦЭ, непосредственно прилегающие к ране.

При электронно-микроскопическом анализе суспензии целомоцитов интактных морских звезд *A. rubens* мы обнаружили 2 типа клеток: мелкие округлые клетки без ярко выраженных признаков дифференцировки (их количество составляет около 3 % от всей клеточной популяции) и более крупные клетки, несущие отростки различной формы на своей поверхности (около 97 %). Мелкие округлые клетки являются, по нашему мнению, недифференцированными (молодыми) целомоцитами, а более крупные клетки с отростками — дифференцированными (зрелыми) целомоцитами. Цитоплазма зрелых целомоцитов содержит лизосомы и фагоцитарные вакуоли, количество и размер которых варьируют в разных клетках данного типа.

В настоящей исследовании в клеточной суспензии мы не обнаружили округлых клеток с гранулами, упоминавшихся в литературе как «клетки с пигментными гранулами» (Booolootain, Guise, 1958), «морулярные клетки» (Коренбаум, Воробьев, 1988; Коренбаум, 1989) или «гемоциты» (Pinsino et al., 2007). Клетки такого типа не были описаны также в другом ультраструктурном исследовании целомоцитов морских звезд (Kaneshiro, Karp, 1980). Возможно, такие клетки не были охарактеризованы нами и авторами цитированной выше работы ввиду их крайней немногочисленности. Интересно, что имеющиеся в литературе описания морулярных клеток весьма схожи с организацией описанных нами в настоящей работе секреторных гранулярных клеток ЦЭ. Поэтому гипотетически можно предположить, что, в то время как амебоциты происходят из жгутиковых клеток ЦЭ, морулярные клетки образуются путем аналогичной миграции в целомическую полость секреторных гранулярных клеток, хотя у нас нет фактических данных за или против такой гипотезы.

Во всех работах, посвященных анализу клеточного состава целомоцитов морских звезд, отмечалось, что фагоцитирующие амебоциты являются абсолютно доминирующей клеточной популяцией (Kaneshiro, Karp, 1980; Коренбаум, Воробьев, 1988; Коренбаум, 1989; Козлова и др., 2006; Pinsino et al., 2007). Наши данные согласуются с этим утверждением. Некоторые из авторов дополнительно подразделяли амебоциты на 2 подгруппы — гранулярные и агранулярные — и описывали в клетках гранулы различной структуры (Коренбаум, Воробьев, 1988; Ко-

ренбаум, 1989; Козлова и др., 2006). Электронно-микроскопические результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что количество, а также структура первичных лизосом и фагосом в зрелых целомоцитах широко варьируют — от практически полного их отсутствия до значительной заполненности цитоплазмы данными органоидами. Поэтому мы считаем, что описанные ранее гранулярные и агранулярные амебоциты представляют собой один тип клеток, находящийся в различном функциональном состоянии, а «гранулы» гранулярных амебоцитов с различной морфологией — первичные и вторичные лизосомы.

Небольшие округлые клетки без выраженных признаков дифференцировки, описанные в настоящей работе, характеризовались ранее как «мелкие клетки» (Козлова и др., 2006) или «лимфоцитоподобные клетки» (Коренбаум, 1989). По нашему мнению, эти клетки представляют собой молодые целомоциты вскоре после их выхода в целомическую полость из ЦЭ. В пользу такого предположения говорят опубликованные ранее данные о том, что относительное количество этих клеток среди целомоцитов резко возрастает через несколько часов после нанесения морской звезде тяжелого поранения и истощения пула содержащихся в целомической жидкости целомоцитов (Козлова и др., 2006).

В одном случае нам удалось наблюдать в составе суспензии целомоцитов клетку с морфологией молодого целомоцита, несущую жгутик на своей поверхности. Мы считаем этот факт дополнительным подтверждением происхождения молодых целомоцитов из клеток ЦЭ. Описания немногочисленных жгутиковых клеток среди целомоцитов морских звезд встречаются в литературе (Коренбаум, Воробьев, 1988; Pinsino et al., 2007).

По литературным данным, при светооптических исследованиях целомоцитов морской звезды в адгезированном состоянии существуют две их формы — «петалоидная» и «филоподиальная» (Коренбаум, Воробьев, 1988). Прижизненные наблюдения динамики целомоцитов продемонстрировали, что они способны быстро преобразовываться из петалоидной формы в филоподиальную, что является признаком их активации (Edds, 1979, 1984, 1993; Коренбаум, Воробьев, 1988; Pinsino et al., 2007). В основе этого преобразования лежат перестройки актинового цитоскелета (Edds, 1979). При электронно-микроскопическом анализе суспензии целомоцитов мы установили, что зрелые целомоциты интактных животных всегда несут на своей поверхности несколько отростков различной структуры. Присутствие этих отростков, очевидно, является способом увеличения клеточной поверхности, необходимой для контакта целомоцита с инородными частицами и микроорганизмами и их последующего фагоцитоза. Вместе с тем целомоциты пораненных морских звезд характеризуются резким увеличением количества и длины филоподиальных отростков.

Эти изменения соответствуют вышеупомянутому преобразованию в активированную «филоподиальную» форму. Кроме того, мы отметили агрегацию целомоцитов пораненных животных, происходящую за счет контакта их филоподий. Эти структурные перестройки необходимы для эффективной реакции тромбообразования в зоне ранения. Структурная реорганизация целомоцитов пораненных животных, очевидно, регулируется некими факторами, появляющимися в целомической жидкости. Свободная диффузия этих факторов приводит к активации целомоцитов не только в зоне ранения, но и во всей це-

ломической жидкости, что и было отмечено нами в суспензии собранных клеток. Формирование многоклеточной сети целомочитов было обнаружено ранее в модельных условиях — при анализе адгезии целомочитов пораненных животных на предметном стекле (Козлова и др., 2006).

Таким образом, по полученным нами данным ультраструктурного анализа, гистогенетический ряд свободноживущих целомочитов выглядит следующим образом: жгутиковая клетка ЦЭ—молодой целомочит со жгутиком—молодой целомочит без жгутика—зрелый целомочит (с различным количеством лизосом и фагосом, т. е. «агранулярный» или «гранулярный»). Стадии свободноживущей молодой округлой клетки со жгутиком и без него являются, очевидно, весьма транзиторными, учитывая относительно немногочисленность популяции данных клеток. Следовательно, большую часть своей жизни целомочиты функционируют как зрелые, активно фагоцитирующие клетки. В условиях поранения зрелые целомочиты способны приобретать филоподиальную форму и агрегировать друг с другом.

Преобразование жгутиковых клеток ЦЭ, безусловно являющихся дифференцированными клетками, в молодые и затем зрелые свободноживущие целомочиты является процессом существенного изменения клеточной структуры, функции и локализации, т. е. процессом трансдифференцировки. Способность иглокожих к трансдифференцировке соматических клеток была отмечена при анализе регенеративных процессов. В частности, у криноидов при регенерации полностью ампутированной кишки обнаружена массовая миграция клеток ЦЭ с их последующей трансдифференцировкой и формированием кластеров предшественников энтероцитов (Mozzi et al., 2006). Сходный процесс описан при регенерации кишки у голотурий (Mashanov et al., 2005).

В целом возможность регенерации с использованием трансдифференцировки клеток существенным образом отличает представителей иглокожих от позвоночных, регенеративные возможности которых связаны с делением и дифференцировкой стволовых клеток (Candia Carnevali, 2006). Парадоксально, но такая эволюционно сформировавшаяся у иглокожих стратегия регенерации намного более эффективна, судя по их несоизмеримо большему по сравнению с позвоночными регенеративному потенциалу. Именно по этой причине дальнейший анализ механизмов регенерации иглокожих с использованием новых клеточных (например, клеточные культуры) и молекулярных подходов приобретает не только фундаментально-научное, но и в перспективе прикладное значение.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 07-04-011190 и 07-04-01376).

Список литературы

- Воронкина И. В., Сакута Г. А., Шарлаимова Н. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 2001. Факторы целомической жидкости морской звезды *Asterias rubens* и их биологическая активность. Цитология. 43 (4) : 331.
- Воронкина И. В., Шарлаимова Н. А., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 2003. Изменение пролиферативной и миграционной активности соматических клеток млекопитающих под действием фракций целомической жидкости регенерирующей морской звезды зависит от присутствия матриксных металлопротеиназ. Цитология. 45 (9) : 861.
- Долматов И. Ю. 1999. Регенерация у иглокожих. Биол. моря. 25 (3) : 191—200.
- Исаева В. В., Коренбаум Е. С. 1989. Защитные функции целомочитов и иммунитет иглокожих. Биол. моря. 15 (6) : 3—14.
- Козлова А. Б., Петухова О. А., Пинаев Г. П. 2006. Анализ клеточных элементов целомической жидкости на ранних сроках регенерации морской звезды *Asterias rubens* L. Цитология. 48 (3) : 175—183.
- Коренбаум Е. С. 1989. Ультраструктура целомочитов морской звезды *Asterias amurensis*. Цитология. 31(10) : 1165—1171.
- Коренбаум Е. С., Воробьев В. А. 1988. Клетки целомической жидкости морской звезды *Asterias amurensis*. Биол. моря. 14 (1) : 27—33.
- Кудрявцев И. В., Полевщиков А. В. 2004. Сравнительно-иммунологический анализ клеточных и гуморальных защитных факторов иглокожих. Журн. общей биол. 65 (3) : 218—231.
- Bargmann W., Behrens B. 1964. Über die Tiedemannschen organe des seesterns (*Asterias rubens* L.). Zeitschr. Zellforsch. 63 : 120—133.
- Bargmann W., von Hehn G. 1968. Über das Axialorgan («mysterious gland») von *Asterias rubens* L. Zeitschr. Zellforsch. 88 : 262—277.
- Beck G., Ellis T., Zhang H., Lin W., Beauregard K., Habicht G., Truong N. 2001. Nitric oxide production by coelomocytes of *Asterias forbesi*. Develop. Comp. Immunol. 25 : 1—10.
- Beck G., Habicht G. 1986. Isolation and characterization of a primitive IL-1-like protein from an invertebrate, *Asterias forbesi*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 83 : 7429—7433.
- Booolootain R., Guise A. 1958. Coelomic corpuscles of echinoderms. Biol. Bull. 115 : 53—63.
- Burton M. 1966. Echinoid coelomic cells. Nature. 211 : 1095—1096.
- Candia Carnevali M. 2006. Regeneration in Echinoderms: repair, regrowth, cloning. Invert. Surv. J. 3 : 64—76.
- Candia Carnevali M., Bonasoro F. 2001. Introduction to the biology of regeneration in echinoderms. Micr. Res. Techn. 55 : 365—368.
- Candia Carnevali M., Lucca E., Bonasoro F. 1993. Mechanism of arm regeneration in the feather star *Antedon mediterranea*: healing of wound and early stages of development. J. Exp. Zool. 267 : 299—317.
- Cobb J. 1978. An ultrastructural study of the dermal papulae of the starfish, *Asterias rubens*, with special reference to innervation of the muscles. Cell Tissue Res. 187 : 515—523.
- Coteur G., Warnau M., Jangoux M., Dubois P. 2002. Reactive oxygen species (ROS) production by amoebocytes of *Asterias rubens* (Echinodermata). Fish and Shellfish Immunol. 12 : 187—200.
- Davidson E. 1953. Clotting of the perivisceral fluid of the Sand dollar, *Echinarachnius parma*. Biol. Bull. 105 : 372.
- Delmotte F., Brillouet C., Leclerc M., Luguët G., Kader J.-C. 1986. Purification of an antibody-like protein from the sea star *Asterias rubens* (L.). Eur. J. Immunol. 16 : 1325—1330.
- Edds K. 1979. Isolation and characterization of two forms of a cytoskeleton. J. Cell Biol. 83 : 109—115.
- Edds K. 1984. Differential distribution and function of microtubules and microfilaments in sea urchin coelomocytes. Cell Motil. Cytoskeleton. 4 : 269—281.
- Edds K. 1993. Cell biology of echinoid coelomocytes. I. Diversity and characterization of cell types. J. Invert. Pathol. 61 : 173—178.
- Ferguson J. 1966. Cell production in the Tiedemann bodies and haemal organs of the starfish, *Asterias forbesi*. Trans. Amer. Microsc. Soc. 85 : 200—209.
- Ferguson J. 1984. Translocative functions of the enigmatic organs of starfish — the axial organ, hemal vessels, Tiedemann's bodies, and rectal caeca: an autoradiographic study. Biol. Bull. 166 : 140—155.
- Fontaine A., Lambert P. 1975. The fine structure of the leucocytes of the holothurian *Cucumaria miniata*. Can. J. Zool. 55 : 1530—1544.

- Giga Y., Ikai A., Takahashi K. 1987. The complete amino acid sequence of echinoidin, a lectin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. J. Biol. Chem. 262 : 6197—6203.
- Heatfield B., Travis D. 1975. Ultrastructural studies of regenerating spines of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. I. Cell types without spherules. J. Morphol. 145 : 13—49.
- Hetzel H. 1963. Studies on holothurian coelomocytes. I. A survey of coelomocyte types. Biol. Bull. 125 : 289—301.
- Hetzel H. 1965. Studies on holothurian coelomocytes. II. The origin of the coelomocytes and the formation of brown bodies. Biol. Bull. 128 : 102—111.
- Holland N., Phillips J., Jr., Giese A. 1965. An autoradiographic investigation of coelomocyte production in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Biol. Bull. 128 : 259—270.
- Holm K., Dupont S., Sköld H., Stenius A., Thorndyke M., Hernroth B. 2008a. Induced cell proliferation in putative haematopoietic tissue of the sea star, *Asterias rubens* (L.). J. Exp. Biol. 211 : 2551—2558.
- Holm K., Hernroth B., Thorndyke M. 2008b. Coelomocyte numbers and expression of HSP70 in wounded sea stars during hypoxia. Cell Tissue Res. 334 : 319—325.
- Johansson M., Säderhäll K. 1996. The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates. Prog. Mol. Subcell. Biol. 15 : 46—66.
- Kakiuchi M., Okino N., Sueyoshi N., Ichinose S., Omori A., Kawabata S., Yamaguchi K., Ito M. 2002. Purification, characterization, and cDNA cloning of alpha-N-acetylgalactosamine-specific lectin from starfish, *Asterina pectinifera*. Glycobiology. 12 : 85—94.
- Kaneshiro E., Karp R. 1980. The ultrastructure of coelomocytes of the sea star *Dermasterias imbricata*. Biol. Bull. 159 : 295—310.
- Kanungo K. 1982. *In vitro* studies on the effect of cell-free coelomic fluid, calcium and/or magnesium on clumping of coelomocytes of sea star *Asterias forbesi* (Echinodermata, Asteroidea). Biol. Bull. 163 : 438—452.
- Leclerc M. 2000. Human kappa-like expression in the axial organ of the sea star *Asterias rubens* (Echinoderma). Eur. J. Morphol. 38 : 206—207.
- Leclerc M., Arneodo V., Legas E., Bajelan M., Vaygier G. 1993. Identification of T-like and B-like lymphocyte subsets in sea star *Asterias rubens* by monoclonal antibodies to human leukocytes. Thymus. 21 : 133—139.
- Legac E., Vaugier G. L., Bousquet F., Bajelan M., Leclerc M. 1996. Primitive cytokines and cytokine receptors in invertebrates: the sea star *Asterias rubens* as a model of study. Scand. J. Immunol. 44 : 375—380.
- Martinez A., Lopez J., Villaro A., Sesma P. 1991. Choanocyte-like cells in the digestive system of the starfish *Marthasterias glacialis* (Echinodermata). J. Morphol. 208 : 215—225.
- Mashanov V., Dolmatov I., Heinzeller T. 2005. Transdifferentiation in holothurian gut regeneration. Biol. Bull. 209 : 184—193.
- Matranga V. 1996. Molecular aspects of immune reactions in Echinodermata. Prog. Mol. Subcell. Biol. 15 : 235—247.
- Millot N. 1969. Injury and the axial organ of echinoids. Experimentia. 15 : 756—757.
- Mladenov P., Bisgrove B., Asotra S., Burke R. 1989. Mechanisms of arm-tip regeneration in the sea star, *Leptasterias hexactis*. Roux's Arch. Develop. Biol. 198 : 19—28.
- Moss K., Hunter J., Thorndyke M. 1998. Patterns of bromodeoxyuridine incorporation and neuropeptide immunoreactivity during arm regeneration in the starfish *Asterias rubens*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 353 : 421—436.
- Mozzi D., Dolmatov I., Bonasoro F., Candia Carnevali M. 2006. Visceral regeneration in the crinoid *Antedon mediterranea*: basic mechanisms, tissues and cells involved in gut redrowth. Centr. Eur. J. Biol. 1 : 609—635.
- Paracer S. 1967. Additional information concerning Tiedemann's bodies of *Asterias forbesi* (Desor). Biol. Bull. 133 : 478.
- Patrino M., Thorndyke M., Candia Carnevali M., Bonasoro F., Beesley P. 2001. Growth factors, heat-shock proteins and regeneration in echinoderms. J. Exp. Biol. 204 : 843—848.
- Pinsino A., Thorndyke M., Matranga V. 2007. Coelomocytes and post-traumatic response in the common sea star *Asterias rubens*. Cell Stress and Chaperones 12 : 331—341.
- Schinke H. 1950. Bildung und Ersatz der Zellelemente der Leibeshöhlenflüssigkeit von *Psammechinus miliaris* (Echinoidea). Zeitschr. Zellforsch. 35 : 311—331.
- Schoenmakers H., Colenbrander P., Peute J., van Oordt P. 1981. Anatomy of the ovaries of the starfish *Asterias rubens* (Echinodermata). A histological and ultrastructural study. Cell Tissue Res. 217 : 577—597.
- Smith L., Chang L., Britten R., Davidson E. 1996. Sea urchin genes expressed in activated coelomocytes are identified by expressed sequence tags. Complement homologues and other putative immune response genes suggest immune system homology within the deuterostomes. J. Immunol. 156 : 593—602.
- Smith L., Clow L., Terwilliger D. 2001. The ancestral complement system in sea urchins. Immunol. Rev. 180 : 16—34.
- Smith L., Davidson E. 1994. The echinoderm immune system. Characters shared with vertebrate immune systems and characters arising later in deuterostome phylogeny. Ann. N. Y. Acad. Sci. 712 : 213—226.
- Smith V. 1981. The echinoderms. In: Invertebrate blood cells. Ratcliffe N., Rowley A. (Eds). London: Acad. Press. 513—562.
- Smith V. 1991. Invertebrate immunology: phylogenetic, ecotoxicological and biomedical implications. Comp. Haematol. Int. 1 : 61—76.
- Smith V., Söderhäll K. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Develop. Comp. Immunol. 15 : 251—261.
- Thorndyke M., Chen W., Beesley P., Patrino M. 2001. Molecular approach to echinoderm regeneration. Micr. Res. Techn. 55 : 474—485.
- Vanden Bossche J., Jangoux M. 1976. Epithelial origin of starfish coelomocytes. Nature. 261 : 227—228.
- Vethamany V., Fung M. 1972. The fine structure of the coelomocytes of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. Can. J. Zool. 50 : 77—81.
- Walker C. 1979. Ultrastructure of the somatic portion of the gonads in asteroids, with emphasis on flagellated-collar cells and nutrient transport. J. Morphol. 162 : 127—162.

ULTRASTRUCTURE OF COELOMIC EPITHELIUM AND COELOMOCYTES OF INTACT AND WOUNDED STARFISH *ASTERIAS RUBENS* L.A. N. Gorshkov,¹ M. I. Blinova, G. P. Pinaev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: angorsh@yahoo.com

Samples of coelomic epithelium and coelomocytes suspension of intact and wounded starfishes *Asterias rubens* L. were analyzed by electron microscopy. It has been demonstrated that coelomic epithelium is composed of three types of cells: flagellar (approx. 60 %), secretory (approx. 3 %) and myoepithelial (approx. 37 %). Flagellar and secretory cells form the apical surface of coelomic epithelium. Secretory cells are represented by two subtypes: granular and mucous secretory cells. Myoepithelial cells are located in the basal zone of the epithelium. Adjacent flagellar cells are separated by intercellular gaps of various size in 4—5 % of cases. These gaps are apparently the lacunae left by the flagellar cells after their departure to the coelomic cavity. The morphological pattern of transition of coelomic epithelium flagellar cells to the coelomocytes has been characterized. No significant structural alterations in organization of the coelomic epithelium were revealed after moderate wounding used in the present study. Small round-shaped young coelomocytes (approx. 3 %) and bigger mature coelomocytes (approx. 97 %) were found in coelomocytes suspension. A flagellum was revealed on the surface of one of the young coelomocytes. Surface of the mature coelomocytes forms the processes of various size and structure; their cytoplasm contains lysosomes and fagocytic vacuoles of different size. After wounding, activation of coelomocytes was noted finding expression in the sharp rise in the number and the length of their surface filopodia, and in the multicellular aggregates formation. By the sum of the ultrastructural data, histogenesis of coelomocytes from the flagellar cells of the coelomic epithelium is supposed to be a process of cellular transdifferentiation.

Key words: *Asterias rubens*, coelomic epithelium, coelomocytes, regeneration.
