

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГИИ
И ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ
И ЦЕЛОМИЧЕСКОГО ЭПИТЕЛИЯ МОРСКИХ ЗВЕЗД
ASTERIAS AMURENSIS И *A. RUBENS***

© Н. С. Шарлаимова,¹ О. А. Петухова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

¹ электронный адрес: nashar@yandex.ru

Идентификация и характеристика клеток, ответственных за восстановление тканей и органов у взрослых организмов является одним из главных вопросов регенеративной биологии. В этом исследовании проведен сравнительный анализ клеточного состава целомической жидкости (ЦЖ) и целомического эпителия (ЦЭ) у двух близких видов *Asterioidea*. Особое внимание уделено характеристике малых клеток (МК, диаметр 4 мкм) с ядерно-цитоплазматическим отношением выше 0,9, без видимых признаков цитодифференцировки. Клетки этого типа у *Asterias rubens* составляют значительную долю в составе ЦЭ, проявляют пролиферативную активность и, возможно, являются клетками-предшественниками для клеток ЦЖ. В составе ЦЖ и ЦЭ амурской звезды *A. amurensis* также выявлены МК, морфологические характеристики которых подобны МК *A. rubens*, обнаружена субпопуляция клеток ЦЭ, слабо связанных с ЦЭ, обогащенная малыми эпителиоцитами (МЭЦ), и показана их способность к миграции из состава ЦЭ. Доля МК у *A. amurensis* существенно меньше, чем у *A. rubens*. Анализ адгезивных способностей клеток ЦЖ и ЦЭ выявил одинаковые закономерности для двух близких видов звезд. Культивирование клеток *A. amurensis* продемонстрировало способность клеток ЦЭ формировать кристалло-подобные структуры, возможно центры скелетообразования, чего не было выявлено у *A. rubens*. Пролиферативной активностью в составе исследованных тканей *A. rubens* и *A. amurensis* *in vivo* и *in vitro* характеризуются как МК, так и более крупные клетки, ядерно-цитоплазматическое отношение которых ниже 0,7. Целоциты *A. amurensis* в отличие от клеток ЦЖ *A. rubens* демонстрируют высокую пролиферативную активность. Обсуждаются гипотезы о происхождении целоцитов.

Ключевые слова: *Asterias amurensis*, *Asterias rubens*, целомический эпителий, пролиферация, клетки-предшественники, целоциты, первичные культуры.

Принятые сокращения: МК — малые клетки, МЭЦ — малые эпителиоциты, ЦЖ — целомическая жидкость, ЦЭ — целомический эпителий, ЦЭ-С — субпопуляция клеток, слабо связанных с целомическим эпителием, ЭЦ — эпителиоциты.

Выдающиеся способности иглокожих к восстановлению утраченных тканей и органов делают их удобной моделью исследования клеточных и молекулярных механизмов регенерации. Толчком к активным исследованиям послужило секвенирование генома морского ежа, который, как оказалось, на 70 % гомологичен геному человека (Sodergren et al., 2006). Поиск клеточных источников регенерации, выявление и характеристика компетентных клеток у взрослых организмов — одно из основных направлений исследований. Для иглокожих приводятся данные об участии в регенерации стволовых клеток, а также о вовлечении процессов трансдифференцировки клеток в восстановление утраченных тканей и органов (Candelaria et al., 2006; Candia Carnevali, 2006; Долматов, 2009; Bobrovskaya, Dolmatov, 2014; Mashanov et al., 2015).

У представителей класса *Asterioidea* исследуются процессы, происходящие при восстановлении лучей, пилорических желез, желудка, а также при бесполом размножении (Candia Carnevali, 2006). Отдельное место занимает

вопрос происхождения целоцитов — клеток целомической жидкости (ЦЖ), восполнение популяции которых при отсутствии интенсивной пролиферации происходит за 5—6 ч (Moss et al., 1998; Козлова и др., 2006; Pinsino et al., 2007; Rinkevich, Matranga, 2009; Hernroth et al., 2010). В качестве наиболее вероятного источника целоцитов рассматривается целомический (перитонеальный) эпителий (ЦЭ) (Vanden Bossche, Jangoux, 1976; Pinsino et al., 2007). Существуют две гипотезы, описывающие механизм восстановления популяции целоцитов. Одна из них предполагает миграцию дифференцированных целоцитов из состава ЦЭ в полость тела в ответ на потерю ЦЖ. Гипотеза подтверждается данными электронной микроскопии о присутствии зрелых целоцитов в составе ЦЭ (Schoenmakers et al., 1981; Горшков и др., 2009). Проведенные нами исследования на беломорской звезде *A. rubens* свидетельствуют в пользу этой гипотезы — в составе ЦЭ нами выявлены клетки, по морфометрическим характеристикам сходные с дифференцирован-

ными агранулоцитами и гранулоцитами ЦЖ (Sharlaimova et al., 2014).

Согласно другой гипотезе, в ответ на потерю ЦЖ происходит миграция жгутиковых клеток ЦЭ в полость тела и их последующая трансдифференцировка за счет потери жгутика и приобретения способности к амебoidalному движению (Vanden Bossche, JanGoux, 1976; Коренбаум, 1989). Основанием служат электронно-микроскопические данные и прижизненные исследования клеточного состава популяций целомоцитов разных видов морских звезд, в ЦЖ которых были выявлены клетки со жгутиком (Johnson, Beeson, 1966; Smith, 1981; Kanungo, 1984). Одним из таких видов является *A. amurensis* (Коренбаум, 1989). Еще одним аргументом в пользу этой гипотезы послужил факт выявления сложного периферического комплекса в клетках ЦЖ, морфологического отличного от корешкового аппарата жгутиковых клеток, но, возможно, являющегося рудиментом жгутика (Kaneshiro, Karp, 1980; Maes, Jangoux, 1983; Коренбаум, 1989).

Важным результатом наших предыдущих исследований, проведенных на беломорской звезде *A. rubens*, явилось выявление субпопуляции клеток, слабо связанных с ЦЭ (ЦЭ-С), которая на 50 % обогащена малыми эпителиоцитами (МЭЦ) (Sharlaimova et al., 2014). Эти клетки (диаметр 4—6 мкм) с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением обладают такой характеристикой стволовых клеток, как пролиферативная активность. Субпопуляция клеток ЦЭ-С занимает пограничное положение между ЦЭ и целомической полостью, поскольку клетки локализованы на поверхности ЦЭ и способны мигрировать из состава эпителия. Пролиферативная активность МЭЦ показана *in vivo* и *in vitro*. Таким образом, совокупность данных позволяет предположить, что восполнение популяции клеток ЦЖ может происходить не только за счет дифференцированных клеток, но и за счет клеток без видимых признаков цитодифференцировки, а именно МЭЦ. Для других видов морских звезд присутствие пула малодифференцированных клеток ЦЭ и их возможное участие в возобновлении популяции целомоцитов в качестве клеток-предшественников не описаны. Однако клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, морфология которых сходна с морфологией МК *A. rubens*, были обнаружены в составе ЦЖ дальневосточной морской звезды *A. amurensis* (Коренбаум, 1989). Этот факт послужил предпосылкой для настоящего исследования.

Цель настоящей работы — поиск и характеристика малодифференцированных и пролиферирующих клеток в составе ЦЖ и ЦЭ амурской морской звезды *A. amurensis* и сравнительный анализ этих клеток у *A. amurensis* и беломорской звезды *A. rubens*, у которой эти клетки были выявлены ранее (Sharlaimova et al., 2014). Для этого проводили гистологический анализ суспензий целомоцитов и клеток ЦЭ *A. amurensis* и морфометрический анализ клеток, обладающих пролиферативной активностью. Исследовали способность МК к миграции из состава ЦЭ в целомическую полость. Анализировали адгезивные способности клеток ЦЖ и ЦЭ после прикрепления к различным субстратам и определяли долю МК среди прикрепившихся. Кроме того, получали первичные культуры целомоцитов и клеток ЦЭ и проводили морфометрический анализ пролиферирующих клеток *in vitro*. Выявлены общие закономерности распределения МК в ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-С и особенности пролиферативной активности у представителей двух близких видов морских звезд.

Материал и методика

Эксперименты с *A. amurensis* проводили в октябре 2013 г. на базе биостанции «Восток» Института биологии моря ДВО РАН (залив Восток, Японское море). Особей диаметром 15—30 см собирали на глубине 5—20 м и содержали в ванне с проточной морской водой в течение всего времени проведения экспериментов. Для сравнительной характеристики морфотипов пролиферирующих клеток *in vivo* и *in vitro* особей *A. rubens* диаметром 10—15 см собирали на глубине 5—8 м в районе о-ва Феттах (на базе Беломорской биологической станции Зоологического института РАН, Кандалакшский залив, губа Чупа, Белое море) в сентябре 2013—2014 гг. и содержали в садках на глубине 3—5 м.

Выделение суспензий клеток ЦЖ, ЦЭ и субпопуляции ЦЭ-С в деталях описано ранее (Sharlaimova et al., 2014). Суспензии целомоцитов получали, отрезая кончик луча и собирая ЦЖ в пробирку с равным объемом солевого раствора без Ca^{2+} и Mg^{2+} (Ca^{2+} -, Mg^{2+} -free salt solution, CMFSS) (Kanungo, 1982), содержащего ЭДТА в конечной концентрации 15 мМ. Суспензии клеток ЦЭ выделяли, обрабатывая фрагменты ЦЭ, отделенные с помощью пинцета с внутренней аборальной поверхности луча, 0.05—0.1 %-ным раствором коллагеназы краба (Биолот, Россия) в течение 20 мин. Субпопуляцию клеток ЦЭ-С содержали в растворе CMFSS после первичной промывки фрагментов ЦЭ до ферментативной обработки.

Суспензии клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-С осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1800 об/мин и ресуспендировали в растворе CMFSS. Эксперименты проводили либо с фиксированными 4%-ным раствором параформальдегида (ПФА) клетками, либо с живыми.

Гистологический анализ суспензий клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-С. Суспензии клеток, фиксированные в 4%-ном ПФА наносили на 1 ч на стекла, покрытые поли-L-лизинном (с мол. массой 70 000—150 000; Sigma, США). Стекла с иммобилизованными клетками погружали в 0.1%-ный водный раствор азур II на 5—7 мин, промывали в дистиллированной воде, проводили через спирты восходящей концентрации, а затем обрабатывали 0.1%-ным спиртовым раствором эозина в течение 2 мин. Далее препараты последовательно промывали в 96%-ном этаноле, изобутаноле и ксилоле и заключали в бальзам. На препаратах оценивали долю клеток каждого морфологического типа. Препараты анализировали с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия).

Иммунофлуоресценция. Для иммунофлуоресцентного анализа клетки после фиксации наносили на стекла, покрытые полилизинном, пермеабилizовывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 и инкубировали в течение ночи при 4 °C с кроличьими антителами против фосфорилированного гистона H3 (Cell Signaling, США) для выявления митотических клеток и (или) мышинными антителами против альфа-тубулина (Sigma, США) для выявления жгутиковых клеток и цитоплазматических структур. Клетки инкубировали с соответствующими вторыми антителами Alexa 488 Fluor и Alexa 546 Fluor (Molecular Probes, США) в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Ядра окрашивали красителем DAPI (Sigma, США). Для анализа митотической активности клеток в культуре, их снимали с поверхности лунок пипетированием, фиксировали 4%-ным ПФА через 1—6 и 11—14 сут

культивирования и окрашивали антителами против фосфорилированного гистона H3, как описано выше. Анализ препаратов и подсчет доли окрашенных клеток проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M и конфокального микроскопа Leica TSC SP5.

Анализ возможности миграции клеток ЦЭ-С из состава ЦЭ *A. amurensis*. Отделение кусочков эпителия при помощи пинцета может повреждать ткань и способствовать выходу клеток из краевых раневых участков. Для того чтобы уменьшить влияние повреждения ткани на способность клеток выселяться из эпителия, проведены эксперименты с «условно-интактным» ЦЭ, когда в опытах использовали целую аборальную часть луча. В разные чашки Петри наносили по 2 мл CMFSS, морской воды или бесклеточной ЦЖ, после чего вырезанную аборальную часть луча звезды помещали внутренней стороной в разные жидкости. Клетки, вышедшие из эпителия, через 20 мин фиксировали в 4%-ном ПФА и окрашивали родамин-фаллоидином (Invitrogen, США) и DAPI. Оценивали общее количество клеток, вышедших из состава ЦЭ в разные жидкости, путем подсчета в камере Горяева и определяли долю МЭЦ (клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением). Эксперимент повторяли дважды.

Анализ популяций клеток ЦЖ и ЦЭ после прикрепления к различным субстратам. 100 мкл суспензий клеток ЦЖ ($1 \cdot 10^6$ кл./мл), ЦЭ и ЦЭ-С ($2 \cdot 10^6$ кл./мл) в морской воде наносили на фибронектин (Sigma, США), ламинин 2/4, полилизин или стекло на 1 ч по методу, описанному ранее (Шарлаимова, Петухова, 2011). Клетки фиксировали в 4%-ном ПФА и окрашивали родамин-фаллоидином и DAPI. Сравнивали суммарное количество клеток, способных прикрепиться к разным субстратам, и оценивали долю МК в каждом варианте эксперимента. Эксперимент проводили дважды.

Получение первичных культур клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-С. Суспензии клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-С дважды промывали раствором CMFSS, содержащим коктейль антибиотиков (200 ед./мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина и 40 мг/л гентамицина), а затем ресуспендировали в модифицированной среде Лейбовича L-15 (Odintsova, Khomenko, 1991) (1100 мОсм), в которую добавляли 2 % эмбриональной фетальной бычьей сыворотки и 40 мг/л гентамицина и наносили на поверхность 24-луночных плат в концентрации $(1-2) \cdot 10^6$ кл./мл. Клетки в культуре анализировали с помощью инвертированных микроскопов Биолом (Россия) и Nikon (Германия) при увеличении объектива $6.3\times$, $10\times$ или $20\times$.

Для статистической обработки данных использовали компьютерную программу STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc.). Подсчет доли клеток проводили в нескольких полях зрения (в сумме не менее 500 клеток) в препаратах, полученных в трех независимых экспериментах, на 10 особях *A. amurensis*. Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $P < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Гистологический анализ суспензий клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-С дальневосточной морской звезды *A. amurensis*. В суспензиях клеток ЦЖ выявлено несколько условных морфологических ти-

пов клеток после окраски азур—эозином. Условность классификации определяется тем, что гистогенетические отношения между разными типами клеток морской звезды еще не выяснены. Доминирующими типами в ЦЖ являются мелкие петалоидные агранулоциты (диаметр ядра 1.8 мкм, диаметр клетки 5 мкм, доля в популяции 34.2 ± 2.4 %), крупные петалоидные агранулоциты (диаметр ядра 2.2 мкм, диаметр клетки 10.5 мкм, доля в популяции 41.7 ± 1.9 %) и гранулоциты (диаметр ядра 2.7 мкм, диаметр клетки 8 мкм и доля в популяции 14.8 ± 1.0 %) (рис. 1, а, 1—3; б, столбцы 1—3). Незначительную долю составляют веретеновидные (1.7 ± 0.5 %) (рис. 1, а, 4; б, столбец 4) и двуядерные (2.4 ± 0.2 %) (рис. 1, а, 5; б, столбец 5) клетки. Для *A. rubens* доминирующими классами также являются мелкие и крупные агранулоциты, однако доля мелких выше, чем у *A. amurensis*, и составляет 43.0 ± 2.8 %, а доля крупных — 14.6 ± 1.7 % (Sharlaimova et al., 2014), что существенно ниже, чем у *A. amurensis*. Доля эозинофильных гранулоцитов в ЦЖ *A. amurensis*, вероятнее всего, может значительно варьировать аналогично *A. rubens*, у которой это значение варьирует от 2 до 15 % в зависимости от животного (Козлова и др., 2006). Доли веретеновидных и двуядерных клеток у двух видов звезд не различаются.

В суспензиях клеток ЦЖ *A. amurensis* также выявлены два типа целомоцитов с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (> 0.9) диаметром 3—4 мкм: с конденсированным примембранным хроматином (рис. 1, а, б) и с ядром, равномерно и интенсивно окрашенным азуром (рис. 1, а, 7). Окраска клеток DAPI подтверждает два варианта распределения хроматина в МК: либо в примембранной области (рис. 1, а, б'), либо равномерно по всему ядру (рис. 1, а, 7). Такой же характер окраски МК с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением был выявлен у *A. rubens* (Sharlaimova et al., 2014). Суммарная доля МК в ЦЖ *A. amurensis* составляет 5.1 ± 1.0 % (рис. 1, б, столбец б+7). Таким образом, оба типа МК ЦЖ выявляются у двух видов морских звезд. Различия заключаются в суммарной доле этих клеток, которая при одинаковом способе получения суспензий клеток существенно выше для беломорской звезды, у которой их доля составляет 13.8 ± 1.7 % (Sharlaimova et al., 2014).

Для *A. amurensis* морфологические типы клеток ЦЖ, подобные рассмотренным выше, были описаны ранее в результате анализа прижизненных и гистологических препаратов клеток, прикрепившихся к стеклу (Коренбаум, Воробьев, 1988). Это агранулярные (50—75 %) и гранулярные (25—50 %) амебоциты и лимфоцитоподобные клетки, характеризующиеся высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Лимфоцитоподобные клетки по морфометрическим характеристикам соответствуют МК с конденсированным примембранным хроматином (рис. 1, а, б, 8). Долю этих клеток авторы не указывают (Коренбаум, Воробьев, 1988). Описанных ими в этой же работе морулярных (1—5 %) и единичных жгутиковых клетках в составе ЦЖ в нашем исследовании не выявлено.

В последующей работе, посвященной амурской звезде, была детально исследована ультраструктура клеток ЦЖ и выявлены особенности структуры амебоцитов, которые в околядерной области содержали сложно организованный периферический комплекс (Коренбаум, 1989). В этой же работе автор уточнял структуру лимфоцитоподобных клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением и диаметром 4—6 мкм: ядро клеток округлое, с большим количеством примембранного кон-

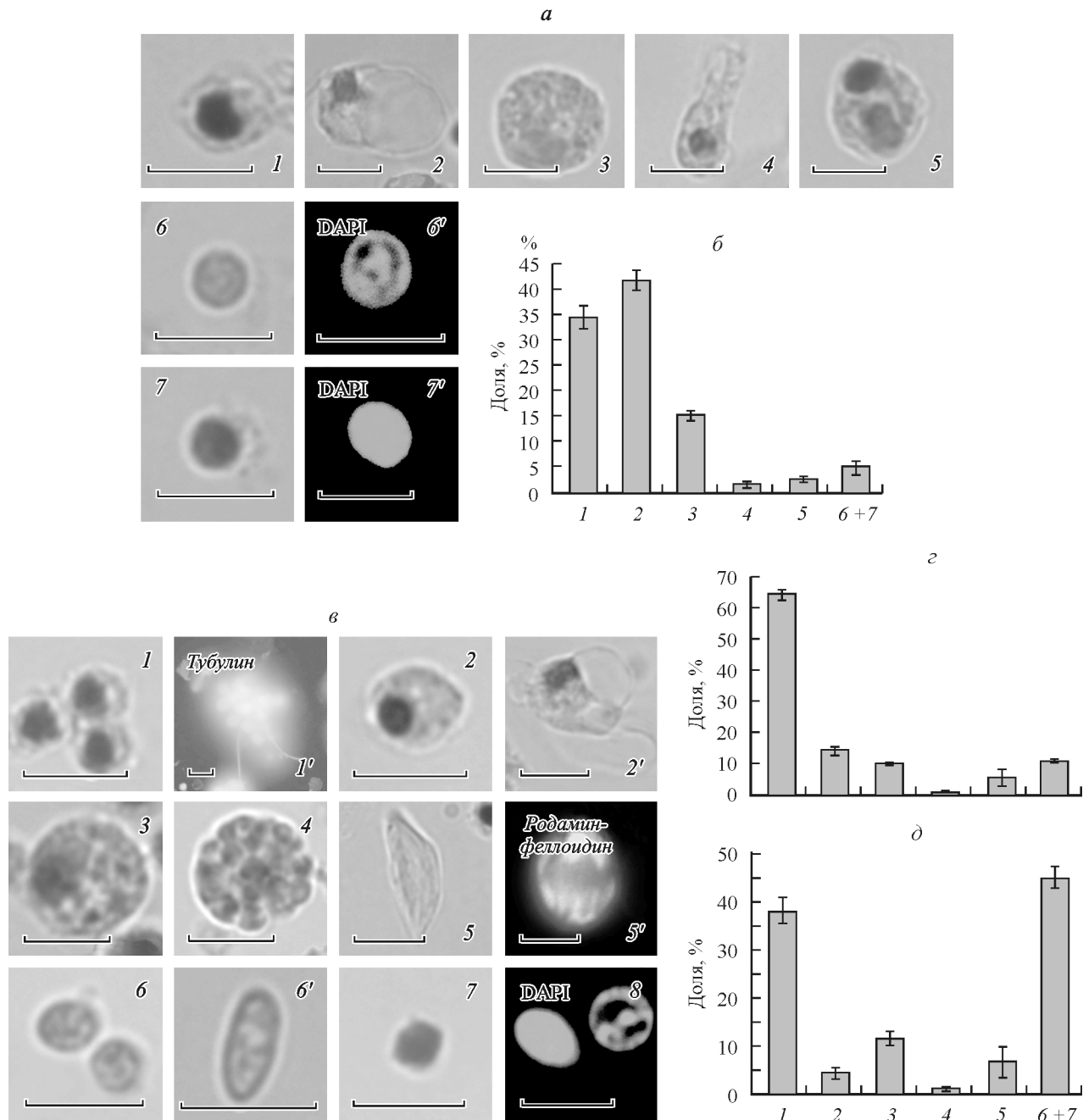


Рис. 1. Клеточный состав и доли морфотипов ЦЖ (а, б), ЦЭ (в, г) и ЦЭ-С (в, д) *Asterias amurensis*.

а — клетки ЦЖ: 1 — мелкий агранулоцит, 2 — крупный агранулоцит, 3 — гранулоцит, 4 — веретеновидный целомоцит, 5 — двуядерная клетка, 6, 6' — малая клетка с конденсированным примембранном хроматином после окраски азур—эозином (6) и DAPI (6'), 7, 7' — малая клетка с равномерно и интенсивно окрашенным ядром после окраски азур—эозином (7) и DAPI (7'). б — доля целомоцитов каждого типа (1—5) и суммарная доля МК (6+7). в — клетки ЦЭ и ЦЭ-С: 1, 1' — мелкие агранулоциты с ядром неправильной формы (жгутиковые клетки) после окраски азур—эозином (1) и антителами против альфа-тубулина (1'), 2, 2' — мелкие (2) и крупные (2') агранулоциты с ацентрически расположенным ядром, 3 — гранулоцит, 4 — морулярная клетка, 5, 5' — безъядерные элементы ЦЭ после окраски азур—эозином (5) и родамин-фаллоидином и DAPI (5'), 6, 6' — МЭЦ с дискретно окрашенным ядром, 7 — МК с равномерно окрашенным ядром, 8 — два типа МК, окраска родамин-фаллоидином и DAPI. г — доля клеток ЦЭ каждого типа (1—5) и суммарная доля МК (6+7). д — доля клеток ЦЭ-С каждого типа (1—5) и суммарная доля МК (6+7). Масштабные отрезки — 5 мкм.

денсированного хроматина и маленьким ядрышком. В тонком слое цитоплазмы выявлялись свободные рибосомы, 1—2 митохондрии и несколько цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума. МК второго типа с равномерно и интенсивно окрашенным ядром, выявленные в нашей работе, Коренбаум (1989) не описаны.

Гистологический анализ суспензий клеток ЦЭ *A. amurensis* проведен впервые. Доминирующим типом

клеток являются мелкие агранулоциты, клетки, стремящиеся к образованию агрегатов ($64.6 \pm 2.1\%$) (рис. 1, в, 1). Ядра этих клеток преимущественно имеют неправильную форму. Двойная окраска антителами против альфа-тубулина и DAPI позволяет определить, что это жгутиковые клетки (рис. 1, в, 1'), которые являются выстилающими клетками перитонеального эпителия. Как показывает морфометрический анализ, жгутиковые ЭЦ

Выход малых клеток из состава условно-интактного целомического эпителия в раствор CMFSS, морскую воду и целомическую жидкость: сравнение *Asterias amurensis* и *A. rubens*

Среда	<i>A. amurensis</i>		<i>A. rubens</i> ^a	
	общее число клеток ($\times 10^6$)	доля малых клеток, %	общее число клеток ($\times 10^6$)	доля малых клеток, %
Раствор CMFSS ^b	15.9	30—36	6.0	62—65
Морская вода	11.1	14—19	2.5	52—60
ЦЖ	5.8	4—11	2.5	30—34

^a По: Sharlaimova et al., 2014; ^b по: Kanungo, 1982.

A. amurensis характеризуется меньшим разбросом размеров клетки (4.5—5.0 мкм) и диаметра ядра (3.0—3.5 мкм) по сравнению со жгутиковыми клетками ЦЭ *A. rubens* (размер клетки 3—5 мкм, диаметр ядра 2.5—3.5 мкм) (Sharlaimova et al., 2014). Помимо этого, в ЦЭ встречаются целоцитоподобные клетки — агранулоциты (14.6 \pm 0.5 %) и гранулоциты (9.4 \pm 0.7 % в популяции) (рис. 1, в, 3; з, столбец 3). Агранулоциты могут быть мелкими (с диаметрами ядра и клетки 2.3 и 4—5.7 мкм соответственно) (рис. 1, в, 2) и крупными (с диаметрами ядра и клетки 3—4 и 9 мкм соответственно) (рис. 1, в, 2'; з, столбец 2).

Морулярные клетки (диаметр ядра 2.2 мкм, диаметр клетки 9—12 мкм) составляют незначительную долю в популяции (0.6 \pm 0.2 %) (рис. 1, в, 4; з, столбец 4), что соответствует доле этих клеток у беломорской звезды. Подобно *A. rubens*, в окрашенных азур—эозином суспензиях клеток ЦЭ амурской звезды *A. amurensis* присутствуют эозинофильные безядерные элементы различных формы и размера, вероятно миоэпителиальные клетки (2—12 мкм) (рис. 1, в, 5), поскольку окраска родамин-фаллоидином выявляет пучки актиновых филаментов (рис. 1, в, 5'; з, столбец 5). Их доля в суспензии клеток *A. rubens* очень варьирует, что подтверждается нашими наблюдениями более чем в 200 независимых экспериментах. Это, по-видимому, связано с индивидуальными особенностями строения ЦЭ. В отличие от беломорской *A. rubens* (Sharlaimova et al., 2014), у *A. amurensis* не выявлено азурофильных гранулоцитов.

МЭЦ были также обнаружены в составе ЦЭ *A. amurensis*, причем подобно МЭЦ *A. rubens*, пул этих клеток подразделяется на два типа: клетки размером 3—6 мкм с дискретно окрашенным ядром и примембранным прилеганием хроматина (МЭЦ-1) (рис. 1, в, 6, 6', 8) и МЭЦ с равномерно интенсивно окрашенным азуром ядром диаметром 2—4 мкм (МЭЦ-2) (рис. 1, в, 7, 8). Суммарная доля МЭЦ в составе ЦЭ *A. amurensis* составляет 10.7 \pm 0.2 % (рис. 1, з, столбец 6+7), что почти в 3 раза ниже, чем у беломорской звезды (27.3 \pm 1.6 %) (Sharlaimova et al., 2014). Подобно *A. rubens*, МЭЦ-1 амурской звезды морфологически сходны с МК, выявленными в составе популяции целоцитов.

Важно отметить, что, как и в случае *A. rubens*, в растворе CMFSS после первичной промывки фрагментов ЦЭ *A. amurensis* также выявлен значительный пул клеток (ЦЭ-С). В этой субпопуляции встречаются клетки тех же морфологических типов, которые обнаружены в ЦЭ, но в других пропорциях (рис. 1, д), и она также обогащена МЭЦ двух типов (рис. 1, д, столбец 6+7). Суммарная доля МЭЦ в субпопуляции клеток ЦЭ-С дальневосточной *A. amurensis* существенно ниже (45.0 \pm 1.3 %; среди них

МЭЦ-1 — 28.6 \pm 1.4, а МЭЦ-2 — 16.4 \pm 0.6 %), чем у *A. rubens* (68.8 \pm 3.0 %; среди них МЭЦ-1 — 49.7 \pm 3.0, МЭЦ-2 — 19.1 \pm 0.8 %) (Sharlaimova et al., 2014).

Таким образом, в составе популяций целоцитов и клеток ЦЭ *A. amurensis* выявлены МК, по морфометрическим характеристикам сходные с МК беломорской *A. rubens*. Кроме того, тоже обнаружена субпопуляция клеток ЦЭ-С, обогащенная МЭЦ, доля которых у амурской звезды значительно ниже.

Миграция клеток ЦЭ *A. amurensis* в целомическую полость. Эксперименты с «условно-интактным» ЦЭ (см. раздел «Материал и методика») показали миграцию клеток в морскую воду, в CMFSS и ЦЖ. Максимальное количество мигрировавших клеток через 20 мин инкубации наблюдали в случае добавления CMFSS (см. таблицу), причем суспензии содержали незначительную долю небольших агрегатов из 2—3 клеток. Суммарная доля МЭЦ составила 27—36 %. Суспензии клеток, мигрировавших в морскую воду и ЦЖ, содержали значительную долю агрегатов, доля МК составила 14—19 и 4—11 % соответственно.

В случае экспериментов с условно-интактным ЦЭ беломорской *A. rubens* (Sharlaimova et al., 2014) максимальный суммарный выход клеток зарегистрирован также в растворе CMFSS. Кроме того, именно в этом случае выявлена большая доля МК, мигрировавших из состава ЦЭ. Следовательно, выявлена зависимость миграции клеток от присутствия в растворах двухвалентных ионов. Таким образом, для *A. amurensis* наблюдали те же закономерности, что и для *A. rubens*, но доля мигрировавших МК меньше по сравнению с долей таких клеток *A. rubens*. Это, по-видимому, связано с более низкой долей клеток этого типа в составе ЦЭ и, возможно, определяется более плотным строением ЦЭ *A. amurensis* амурской звезды, который легко отделяется пинцетом от экзоскелета в виде цельного плотного лоскута, тогда как ЦЭ *A. rubens* отделяется в виде небольших непрочных кусков.

Анализ популяций клеток ЦЖ и ЦЭ после прикрепления к различным субстратам. Иммунофлуоресцентный анализ культивируемых клеток требует их посева на покровные стекла. В случае *A. rubens* показано, что клетки, первоначально прикрепившиеся к покровному стеклу, через 1 сут культивирования мигрируют на поверхность лунки, что не позволяет анализировать клетки в культуре. В предыдущей работе была исследована возможность культивирования клеток ЦЭ на различных субстратах и показано, что ламинин 2/4 является тем лигандом, к которому избирательно прикрепляются МЭЦ. Именно ламинин послужил субстратом, на котором культивировали клетки и анализировали пролиферативную активность клеток *A. rubens* в культуре

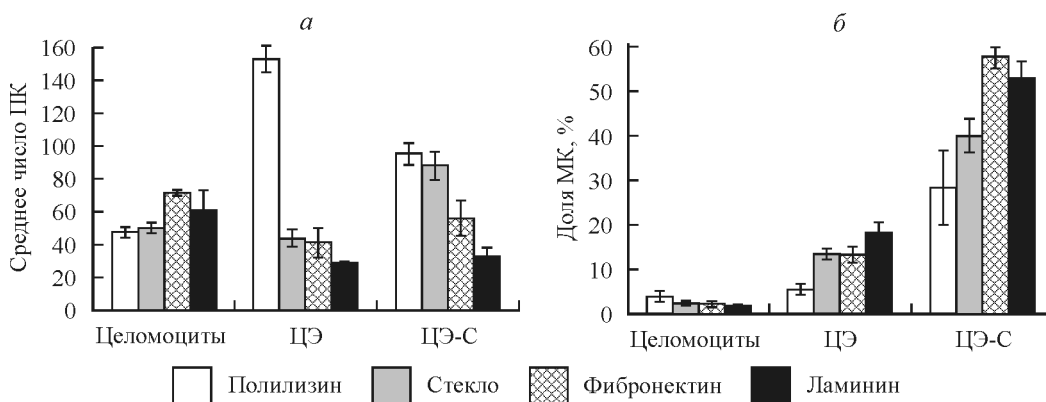


Рис. 2. Выявление доли МК в составе популяций целомоцитов, клеток ЦЭ и ЦЭ-С, способных прикрепляться к разным субстратам (полилизину, стеклу, фибронектину и ламинину).

а — среднее число прикрепившихся клеток (ПК) в одном поле зрения; б — доля МК, %.

(Шарлаимова, Петухова, 2011; Sharlaimova et al., 2014). Для того чтобы охарактеризовать адгезивные свойства клеток *A. amurensis* и главным образом сравнить адгезию МК двух видов звезд, сравнивали способности клеток *A. amurensis* прикрепляться к иммобилизованным белкам внеклеточного матрикса — фибронектину, ламинину 2/4 и к неспецифическим субстратам — полилизину и стеклу. Взаимодействие клеток с полилизинном обусловлено его положительным зарядом и не является специфическим.

Оценка суммарного количества клеток, способных прикрепиться к тому или иному субстрату через 1 ч инкубации в морской воде, показывает, что, подобно клеткам *A. rubens* (Шарлаимова, Петухова, 2011), максимальное количество клеток ЦЖ *A. amurensis* прикрепляется к фибронектину; для клеток ЦЭ наиболее предпочтительным субстратом является полилизин; для ЦЭ-С — полилизин и стекло. У амурской звезды, так же как и у беломорской, к ламинину в целом прикрепляется минимальное количество клеток ЦЭ и ЦЭ-С (рис. 2, а). Таким образом, целомоциты, клетки ЦЭ и ЦЭ-С обладают общими для двух видов звезд закономерностями прикрепления к различным субстратам.

Подобно *A. rubens* (Шарлаимова, Петухова, 2011), МК были выявлены на каждом из субстратов, но МК ЦЭ и ЦЭ-С избирательно прикрепляются к специфическим лигандам (фибронектину и ламинину). Причем для МЭЦ наиболее предпочтительным субстратом является ламинин, а для МК субпопуляции ЦЭ-С — ламинин и фибронектин (рис. 2, б). Это говорит о различных адгезивных характеристиках ЦЭ и ЦЭ-С.

Клетки ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-С морской звезды *A. amurensis* в условиях первичной культуры. Клетки ЦЖ *A. amurensis* через 12 ч после посева формируют «сети» и агрегаты, часть из них образует синцитии. В дальнейшем наблюдаются постепенное объединение клеток в крупные агрегаты и уменьшение числа распластанных клеток (рис. 3, I, а—з). Эти закономерности типичны также для культивируемых целомоцитов *A. rubens* (Шарлаимова и др., 2010).

Клетки ЦЭ и ЦЭ-С *A. amurensis* также демонстрируют сходное с клетками *A. rubens* (Шарлаимова и др., 2010) поведение в культуре в течение 6 сут. Через 12 ч после посева выявлены хорошо распластанные крупные клетки, которые образуют сети, подвижные агрегаты жгутиковых клеток и одиночные прикрепленные клетки (рис. 3, II, а,

б). Через 4 сут культивирования большая часть агрегатов жгутиковых клеток оседает на поверхность лунок и теряет подвижность, число распластанных целомоцитоподобных клеток сокращается. На более поздних сроках (через 7 сут) в культурах ЦЭ и ЦЭ-С наблюдали образование «кристаллов» с многогранной структурой (рис. 3, II, в, з), а через 2 нед их количество постепенно увеличивается. Появление этих структур может свидетельствовать о формировании в культуре известковых центров скелетообразования, но это предположение требует дальнейшего изучения. Феномен способности клеток иглокожих к спикулогенезу в культуре ранее описан у эмбриональных первичных культур клеток морских ежей (Кипрюшина, Одинцова, 2011; Knapp et al., 2012; Odintsova et al., 2015). Для взрослых особей морских звезд таких данных не приводили. Общей чертой для культур клеток ЦЭ *A. rubens* и *A. amurensis* является появление окрашенных включений, возможно пигментных клеток (рис. 3, III, а, б).

Пролиферативная активность клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-С *A. amurensis* in vivo и in vitro. Способность к пролиферации является важнейшим свойством МЭЦ *A. rubens* (рис. 4, I, а). Результаты многолетних экспериментов показывают, что включение бромдезоксипридина (для оценки ДНК-синтетической активности) и окраска антителами против фосфорилированного гистона H3 (на митотическую активность) стабильно регистрировались только в ЦЭ, хотя и на низком уровне, тогда как пролиферативная активность клеток ЦЖ встречалась лишь в единичных случаях (Шарлаимова и др., 2010). Окрашивание суспензий клеток антителами против фосфорилированного гистона H3 и альфа-тубулина, проведенное в данном исследовании, выявило, что помимо МЭЦ пролиферативную активность в ЦЭ *A. rubens* проявляют также клетки другого морфотипа (диаметром 5–8 мкм), ядерно-цитоплазматическое отношение которых ниже 0.7. Альфа-тубулин в этих клетках выявляется либо в виде диффузного окрашивания (рис. 4, I, б), либо в виде тяжей (рис. 4, I, в). В ЦЖ митотическую активность проявляли как МК, так и более крупные клетки диаметром 7–11 мкм, ядерно-цитоплазматическим отношением которых ниже 0.7.

В отличие от целомоцитов *A. rubens* таковые *A. amurensis* стабильно проявляли митотическую активность, которая выявлялась в МК (рис. 4, I, з) и в более крупных клетках (6–11 мкм), ядерно-цитоплазматическое отношение которых ниже 0.7 (рис. 4, I, д). Доля митотических

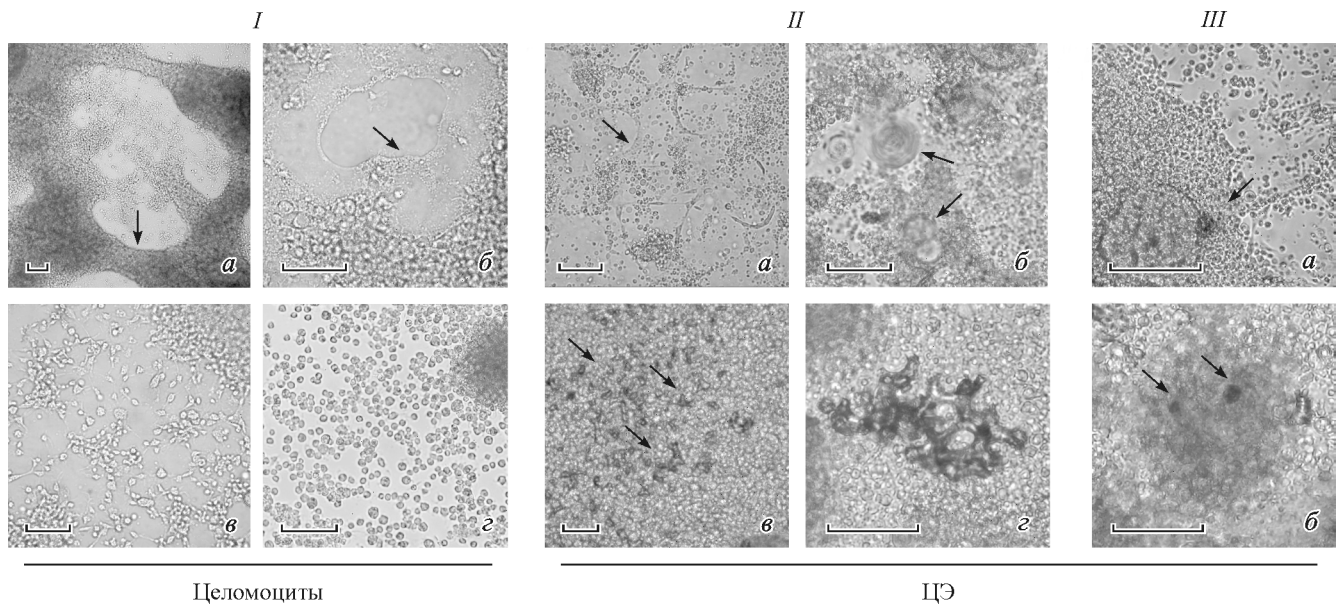


Рис. 3. Клетки ЦЖ (I), ЦЭ (II) и пигментные включения (III) *Asterias amurensis* в процессе культивирования. Световая микроскопия.

I: а, б — целоциты через 1 сут после посева, формирование «сетей» (а) и синцитиев (б) (стрелка); в — распластанные клетки на 5-е сут культивирования; г — округлые клетки на 14-е сут культивирования. II: а — распластанные клетки ЦЭ через 1 сут после посева; б — вращающиеся агрегаты жгутиковых эпителиоцитов (стрелки); в, г — формирование «кристаллов» (стрелки) в культурах клеток ЦЭ и ЦЭ-С на 7-е сут при разных увеличениях. III — сравнение пигментных включений в клетках *A. amurensis* (а) и *A. rubens* (б). Масштабные отрезки — 50 мкм.

целоцитов у отдельных особей *A. amurensis* достигала 5—20 %, как показывают результаты индивидуального анализа 10 животных.

Пролиферативная активность клеток ЦЭ и ЦЭ-С *A. amurensis* выявлена в МК (рис. 4, I, е) и крупных ЭЦ (6—10 мкм) и находится на низком уровне. Доля митотических клеток не превышает 0.1 %, однако это на порядок выше, чем у *A. rubens* (не более 0.01 %). У амурской звезды крупные пролиферирующие клетки характеризуются специфичной структурой тубулинового цитоскелета, выявляемого в виде тяжей (рис. 4, I, ж).

Таким образом, пролиферативная активность клеток *A. amurensis* выявляется на более высоком уровне по сравнению с беломорской звездой *A. rubens*, особенно для целоцитов. Этот факт, безусловно, заслуживает детального анализа и делает *A. amurensis* удобным объектом для исследования пролиферации именно целоцитов. В литературе этот факт для амурской звезды не описан. Но, по-видимому, пролиферация целоцитов не уникальное свойство амурской звезды, о чем свидетельствуют данные о ДНК-синтетической активности клеток ЦЖ *A. rubens* (Holm et al., 2008; Шарлаимова и др., 2010).

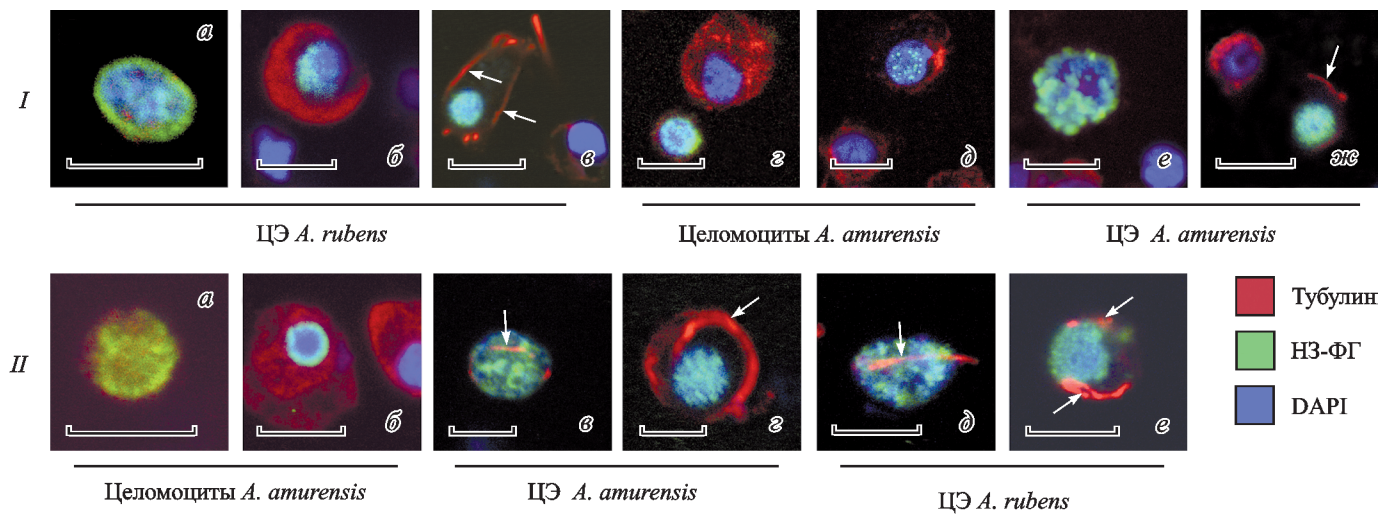


Рис. 4. Типы пролиферирующих клеток *Asterias rubens* и *A. amurensis*, окраска антителами против фосфорилированного гистона H3 (зеленый), альфа-тубулина (красный) и DAPI (синий).

I — митотические клетки *A. rubens* (а—в) и *A. amurensis* (г—ж) in vivo: а — МЭЦ; б — крупная клетка ЦЭ с равномерным распределением альфа-тубулина; в — крупная клетка ЦЭ с тяжями тубулина (стрелки); г — малый целоцит; д — крупный целоцит; е — МЭЦ; ж — крупный ЭЦ *A. amurensis* с тяжем тубулина. II — пролиферирующие клетки в культуре: а, б — целоциты *A. amurensis*; в, г — клетки ЦЭ *A. amurensis*; клетки ЦЭ *A. rubens* с тяжем тубулина. Масштабные отрезки — 5 мкм.

Возможно, мы столкнулись с однократной или сезонной повышенной митотической активностью клеток амурской звезды, являющейся физиологической реакцией невыявленного генеза.

Анализ целомоцитов *A. amurensis*, культивируемых в течение 1—14 сут, показал, что митотическая активность сохраняется в течение 7 сут. Доля окрашенных клеток через 1 сут культивирования достигает $21.0 \pm 1.3\%$, однако уже через 2 сут начинает снижаться ($12.9 \pm 1.4\%$), позднее активность угасает, что, по данным литературы, является типичным для клеток морских беспозвоночных (Rinkevich, 2011). Общая картина поведения целомоцитов двух видов морских звезд при культивировании на поверхности культуральных плат сходна, однако митотическая активность клеток ЦЖ выявлена только для культуры *A. amurensis* (Шарлаимова и др., 2010).

Доля делящихся клеток ЦЭ и ЦЭ-С *A. amurensis* высока на протяжении всего периода культивирования (14 сут) и составляет около 0.1%, что соответствует доле митотических клеток ЦЭ *in vivo*. Более поздние сроки (2 мес), на которых была выявлена пролиферативная активность *A. rubens*, не анализировали.

Митотическую активность в первичной культуре целомоцитов и клеток ЦЭ проявляют клетки нескольких типов. Среди целомоцитов это МК с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (рис. 4, II, а) и крупные клетки, ядерно-цитоплазматическое отношение которых ниже 0.7 (рис. 4, II, б). Для клеток ЦЭ и ЦЭ-С это также МК с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (рис. 4, II, в) и более крупные клетки (рис. 4, II, з). Для обоих типов делящихся клеток ЦЭ характерно присутствие тяжа тубулина. Сходной морфологией обладают в культуре пролиферирующие клетки ЦЭ *A. rubens* (рис. 4, II, д, е).

Анализ пролиферирующих клеток двух видов звезд показывает, что как в ЦЖ, так и в ЦЭ способность к делению характерна для МК и для более крупных клеток с ядерно-цитоплазматическим отношением меньше 0.7. Вопрос о том, принадлежат ли делящиеся клетки ЦЖ и ЦЭ к одному классу, которые мигрируют из состава эпителия в полость тела или наоборот, остается предметом будущих исследований. Различный характер окраски антителами против тубулина целомоцитов и клеток ЦЭ может свидетельствовать либо о том, что эти клетки относятся к разным типам, либо это проявление разных стадий деления.

Сравнительный анализ двух близких видов Asteroidea выявил общие черты клеточного состава ЦЖ и ЦЭ, однако в тканях *A. amurensis* доля МК существенно ниже, чем у *A. rubens*. Выявлены общие для двух видов морских звезд закономерности прикрепления клеток ЦЖ и ЦЭ к различным субстратам, а также аналогичное поведение в культуре. Пролиферирующие клетки демонстрируют сходную морфологию для двух видов звезд, но пролиферативная активность *in vivo* и *in vitro* различна, что выражается в более высокой пролиферативной активности клеток ЦЖ *A. amurensis*. Подобно *A. rubens* у *A. amurensis* обнаружена субпопуляция клеток ЦЭ-С, обогащенная МЭЦ, что подтверждает существование пула клеток без выраженных признаков цитодифференцировки на границе ЦЭ и ЦЖ, возможно являющихся клетками-предшественниками для целомоцитов. Вопрос о том, являются эти клетки результатом дедифференцировки жгутиковых клеток перитонеального эпителия (Jangoux, Vanden Bossche, 1975), которые дальше могут дифференцироваться в

клетки ЦЖ, или же эти клетки поступают из других тканей звезды, являющихся предполагаемыми депо клеток-предшественников (тидемановых телец, аксиального органа или подлежащих слоев перитонеального эпителия), остается открытым. Во всяком случае, дедифференцировка жгутиковых клеток, если события развиваются по предполагаемому механизму, происходит в составе ЦЭ, а не в ЦЖ, поскольку жгутиковых клеток в ЦЖ не выявлено.

Авторы благодарят администрацию и сотрудников ББС ЗИН РАН «Картеш» и биостанции «Восток» ИБМ ДВО РАН и особенно сотрудников ИБМ ДВО РАН Н. А. Одинцову (Лаборатория «Клеточные технологии») и Н. С. Шелудько (Лаборатория «Биофизика клетки») за всестороннюю помощь в проведении работы. Авторы признательны Г. Г. Полянской (ИНЦ РАН) за конструктивное обсуждение результатов работы и И. И. Ермаковой (ИНЦ РАН) за любезно предоставленный ламинин.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 13-04-90789 и 15-04-07798а).

Список литературы

- Горшков А. Н., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 2009. Ультраструктура целомического эпителия и целомоцитов морской звезды *Asterias rubens* L. в норме и после нанесения раны. Цитология. 51 (8): 650—662. (Gorshkov A. N., Blinova M. I., Pinaev G. P. 2009. Ultrastructure of coelomic epithelium and coelomocytes of the starfish *Asterias rubens* L. in norm and after wounding. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 3 (5): 477—490.)
- Долматов И. Ю. 2009. Регенерация пищеварительной системы у голотурий. Журнал общей биол. 70 (4): 316—327. (Dolmatov I. Yu. 2009. Regeneration of the digestive system in holothurians. Zh. Obshchey Biol. 70 (4): 316—327.)
- Кипрюшина Ю. О., Одинцова Н. А. 2011. Влияние экзогенных факторов на индукцию спикулогенеза в культурах эмбриональных клеток морских ежей. Онтогенез. 42 (5): 390—396. (Kipriushina Yu. O., Odintsova N. A. 2011. Effect of exogenous factors on the induction of spicule formation in sea urchin embryonic cell cultures. Russ. J. Develop. Biol. (Ontogenez). 42 (5): 330—336.)
- 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. (Kozlova A. B., Petukhova O. A., Pinaev G. P. 2006. The analysis of cellular elements in coelomic fluid during early regeneration of the starfish *Asterias rubens* L. Tsitologiya. 48 (3): 175—183.)
- Коренбаум Е. С. 1989. Ультраструктура целомоцитов морской звезды *Asterias amurensis*. Цитология. 31 (10): 1165—1170. (Korenbaum E. S. 1989. Ultrastructure of coelomocytes of sea star *Asterias amurensis*. Tsitologiya. 31 (10): 1165—1171.)
- Коренбаум Е. С., Воробьев В. А. 1988. Клетки целомической жидкости морской звезды. Биол. моря. 1: 27—33. (Korenbaum E. S., Vorobyev V. A. 1988. The cells of the coelomic fluid of starfish. Biol. Morya. 1: 27—33.)
- Шарлаимова Н. С., Петухова О. А. 2011. Характеристика популяций клеток целомической жидкости и целомического эпителия морской звезды *Asterias rubens* L., способных прикрепляться и распластываться на различных субстратах. Цитология. 53 (11): 891—902. (Sharlaimova N. S., Petukhova O. A. 2012. Characteristics of populations of the coelomic fluid and coelomic epithelium cells from the starfish *Asterias rubens* L. able attach to and spread on various substrates. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 6 (2): 176—188.)

- Шарлаимова Н. С., Пинаев Г. П., Петухова О. А. 2010. Сравнительный анализ поведения и пролиферативной активности в культуре клеток целомической жидкости и клеток различных тканей морской звезды *Asterias rubens* L., полученных из нормальных и травмированных животных. Цитология. 52 (4) : 317—325. (Sharlaimova N. S., Pinaev G. P., Petukhova O. A. 2010. Comparative analysis of behavior and proliferative activity in culture of cells of coelomic fluid and of cells of various tissues of the sea star *Asterias rubens* L. isolated from normal and injured animals. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 4 (3) : 280—288.)
- Bobrovskaya N. V., Dolmatov I. Y. 2014. Autotomy of the visceral mass in the feather star *Himerometra robustipinna* (Crinoidea, Comatulida). Biol. Bull. 226 : 81—91.
- Candelaria A. G., Murray G., File S. K., Garcia-Ararras J. E. 2006. Contribution of mesenterial muscle dedifferentiation to intestine regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. Cell Tissue Res. 325 : 55—65.
- Candia Carnevali M. D. 2006. Regeneration in Echinoderms: repair, regrowth, cloning. Invertebrate Survival J. 3 : 64—76.
- Hernroth B., Farahani F., Brunborg G., Dupont S., Dejnek A., Skold H. N. 2010. Possibility of mixed progenitor cells in sea star arm regeneration. J. Exp. Zool. B. Mol. Develop. Evol. 314 : 457—468.
- Holm K., Dupont S., Skold H., Stenius A., Thorndyke M., Hernroth B. 2008. Induced cell proliferation in putative haematopoietic tissues of the sea star, *Asterias rubens* (L.). J. Exp. Biol. 211 : 2551—2558.
- Jangoux M., Vanden Bossche J.-P. 1975. Morphology and dynamics of the coelomocytes of *Asterias rubens* L. (Echinodermata, Asteroidea). Forma Functio. 8 : 191—208.
- Johnson P. T., Beeson R. J. 1966. *In vitro* studies on *Patiria mininata* (Brandt) coelomocytes, with remarks on revolving cysts. Life Sci. 5 : 1641—1666.
- Kaneshiro E. S., Karp R. 1980. The ultrastructure of coelomocytes of the sea star *Dermasterias imbricata*. Biol. Bull. 159 : 295—310.
- Kanungo K. T. 1982. *In vitro* studies on the effect of cell-free coelomic fluid, calcium, and/or magnesium on clumping of coelomocytes of the sea star *Asterias forbesi* (Echinodermata: Asteroidea). Biol. Bull. 163 : 438—452.
- Kanungo K. T. 1984. The coelomocytes of asteroid Echinoderms. In: Comparative pathobiology. New York: Plenum Press. 6 : 7—39.
- Knapp R. T., Wu C. H., Mobilia K. C., Joester D. 2012. Recombinant sea urchin vascular endothelial growth factor directs single-crystal growth and branching *in vitro*. J. Amer. Chem. Soc. 134 : 17 908—17 911.
- Maes Ph., Jangoux M. 1983. Occurrence of a well-developed pericentriolar complex within the cytoplasm of asteroid coelomocytes (Echinodermata). Develop. Comp. Immunol. 7 : 691—694.
- Mashanov V. S., Zueva O. R., Garcia-Ararras J. E. 2015. Expression of pluripotency factors in echinoderm regeneration. Cell Tissue Res. 359 : 521—536.
- Moss C., Hunter A. J., Thorndyke M. C. 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.
- Odintsova N. A., Ageenko N. V., Kipyryushina Yu. O., Maiorova M. A., Boroda A. V. 2015. Freezing tolerance of sea urchin embryonic cells: Differentiation commitment and cytoskeletal disturbances in culture. Cryobiology. 71 : 54—63.
- Odintsova N. A., Khomenko A. V. 1991. Primary cell culture from embryos of the Japanese scallop *Mizuchopecten yessoensis* (Bivalvia). Cytotechnology. 6 : 49—54.
- Pinsino A., Thorndyke M. C., Matranga V. 2007. Coelomocytes and post-traumatic response in the common sea star *Asterias rubens*. Cell Stress Chaperones. 12 : 331—341.
- Rinkevich B. 2011. Cell cultures from marine invertebrates: new insights for capturing endless stemness. Mar. Biotechnol. (New York). 13 : 345—354.
- Rinkevich B., Matranga V. 2009. Stem cells in marine organisms. London: SpringerLink. 367 p.
- Schoenmakers H. J. N., Colenbrander P. H. J. M., Peute J., van Oordt P. G. W. J. 1981. Anatomy of the ovaries of the starfish *Asterias rubens* (Echinodermata) a histological and ultrastructural study. Cell Tissue Res. 217 : 577—597.
- Sharlaimova N. S., Shabelnikov S. V., Petukhova O. A. 2014. Small coelomic epithelial cells of the starfish *Asterias rubens* L. that are able to proliferate *in vivo* and *in vitro*. Cell Tissue Res. 356 : 83—95.
- Smith V. J. 1981. The echinoderms. In: Invertebrate blood cells. (Ed. Ratcliffe N. A. and Rowley T.). London: Acad. Press. 513—562.
- Sodergren A. et al. 2006. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Science. 314 : 941—952.
- Vanden Bossche J. P., Jangoux M. 1976. Epithelial origin of starfish coelomocytes. Nature. 261 : 227—228.

Поступила 22 II 2016

THE COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF MORPHOLOGY AND PROLIFERATIVE ACTIVITY OF COELOMIC FLUID AND COELOMIC EPITHELIUM CELLS IN STARFISH *ASTERIAS AMURENSIS* AND STARFISH *A. RUBENS*

N. S. Sharlaimova,¹ O. A. Petukhova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

¹ e-mail: nashar@yandex.ru

Identification and characterization of cells responsible for the restoration of tissues in adult organisms is one of the main problems in regenerative biology. In this study, the comparative histological analysis of cellular suspensions in coelomic fluid (CF) and coelomic epithelium (CE) of two close species of Asteroidea has been done. Particular attention was paid to characteristics of small epithelial cells (SECs, diameter 4 μm) with high nuclear-cytoplasmic ratio more 0.9 and without visible signs of differentiation. Cells of this type constitute a significant proportion in CE in *Asterias rubens*, show proliferative activity and are probably the progenitor cells for the coelomocytes. Small cells with parameters identical to those of *A. rubens* SECs have been found both in CF and CE of *A. amurensis*. We have found subpopulation of weakly attached CE cells highly enriched with SECs-1. These cells were able to migrate from CE. Analysis of adhesion ability of CF and CE cells has revealed the same patterns for these two closely related starfish. Two-week primary cultures have demonstrated the speciality of *A. amurensis* CE cells consisting in the formation of «crystals», the potential centers of spiculoge-

nesis that have not been revealed in *A. rubens*. Both small cells and larger cells with nuclear-cytoplasmic ration lower than 0.7 demonstrated proliferative activity *in vivo* and *in vitro*. Moreover, more high mitotic activity of coelomocytes has been found in *A. amurensis*. The hypotheses of coelomocytes origin are discussed.

Key words: *Asterias amurensis*, *Asterias rubens*, coelomic epithelium, proliferation, progenitor cells, coelomocytes, primary cell culture.
