

© М. В. Столярова, А. П. Касаткина, 2019
УДК 575.85:576.31:576.52

М. В. Столярова¹, А. П. Касаткина²

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МНОГОСЛОЙНОГО КОЖНОГО ЭПИТЕЛИЯ *AIDANOSAGITTA MACILENTA* (CHAETOGNATHA) И ИХ ЭВОЛЮЦИОННОЕ ЗНАЧЕНИЕ

¹ Кафедра гистологии и эмбриологии им. проф. А. Г. Кнорре (зав. — доц. В. Г. Кожухарь), ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России;
² лаборатория экологии (зав. — д-р биол. наук П. М. Жадан), ФГБУН «Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичёва» ДВО РАН

Цель работы — детальное исследование ультраструктурных особенностей многослойного кожного эпителия *Aidanosagitta macilenta* — представителя типа щетинкочелюстных (*Chaetognatha*), рассматриваемых как древняя, рано отделившаяся ветвь *Bilateria*.

Материал и методы. Методом просвечивающей электронной микроскопии исследован вид *Aidanosagitta macilenta* Kassatkina (тип *Chaetognatha*, сем. *Sagittidae*). Материал собран в летний период (июнь — август) в заливе Петра Великого (Японское море). Животных фиксировали 40–60 мин при 4 °С 2,5% глутаральдегидом на какодилатном буфере (pH 7,4) с постфиксацией 2% OsO₄. Зафиксированный материал обезжировали и заливали в аралдит. Ультратонкие срезы просматривали на электронных микроскопах JEM-7, JEM-100B.

Результаты. Получены данные об уникальных особенностях строения эпителия: фибриллярная структура цитоплазмы клеток, особые «мостичные» контакты, не имеющие аналогов среди известных типов межклеточных соединений, примитивная миелинизация нервных волокон, расположенных интраэпителиально. Кожный эпителий щетинкочелюстных является примитивной двухкомпонентной тканевой системой, в которой эпителиальные клетки тесно связаны с элементами нервной ткани.

Выводы. Наличие многослойного кожного эпителия, особых «мостичных» контактов и митохондрий с трубчатыми кристами свидетельствует об обособленном положении *Chaetognatha*. Многослойный кожный эпителий щетинкочелюстных и эпидермис позвоночных не тождественны по своему строению, они представляют случай тканевых параллелизмов. Можно предполагать, что гипотетические предки *Bilateria* обладали покровами, в которых были совмещены эпителиальные и нейральные элементы.

Ключевые слова: эпителии, *Chaetognatha*, межклеточные контакты, эволюция

Введение. Становление тканевой организации и возникновение эпителиальной ткани в процессе эволюции многоклеточных животных — одна из фундаментальных проблем современной биологии. В настоящее время имеется большой материал по строению эпителиев, указывающий на дивергентное развитие разных видов эпителиальной ткани. В то же время, на клеточном и тканевом уровнях отмечаются черты сходства, возникающие параллельно и независимо в разных систематических группах [2]. Поскольку признается, что именно ультраструктурные признаки наиболее консервативны и поэтому пригодны для филогенетического сравнения [3], особенно актуально сравнительное изучение ультраструктуры клеток и тканей представителей разных систематических групп. Большое количество работ с использованием молекулярно-

генетического подходов посвящаются изучению низших многоклеточных и вопросу происхождения *Metazoa* [12], анализу полухордовых [4, 14], хордовых [6] и происхождению позвоночных и человека [8, 11]. Молекулярно-генетические методы, ценность которых не подлежит сомнению, проясняют многие вопросы филогении, но не дают ответа на вопрос о морфологических преобразованиях тканей в процессе эволюции.

Уникальный эволюционный феномен представляют щетинкочелюстные, или морские стрелки (*Chaetognatha*), обладающие многослойным кожным эпителием — единственный случай среди беспозвоночных. Щетинкочелюстные — морские свободноживущие животные, постоянные представители планктона. На основании некоторых морфологических и эмбриологических признаков щетинкочелюстных сближают с вто-

Сведения об авторах:

Столярова Марина Владимировна (e-mail: mvstolyarova@yandex.ru), кафедра гистологии и эмбриологии им. проф. А. Г. Кнорре, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2

Касаткина Алла Петровна (e-mail: apkas@mail.ru), лаборатория экологии, ФГБУН «Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичёва» ДВО РАН, 690041, Россия, г. Владивосток, ул. Балтийская, 43

ричноротыми, однако молекулярно-генетические исследования не подтверждают эту точку зрения [10, 13]. Интерес к изучению этой группы еще более вырос в связи с результатами молекулярно-генетических исследований, на основании которых Chaetognatha рассматриваются как рано отделившаяся группа (ветвь) первичноротых [9], близкая к общему предку билатерально-симметричных животных (Bilateria). Это предположение согласуется с палеонтологическими находками древних животных (Euconodonta), которые считаются близкими родственниками щетинкочелюстных [5]. В последние годы появилось значительное число исследований, посвященных изучению генома, строения нервной системы, особенностям эмбрионального развития щетинкочелюстных. Однако подробно изучены лишь отдельные виды морских стрелок.

Цель настоящей работы — изучение ультраструктурной организации уникальной тканевой системы — многослойного кожного эпителия у представителя щетинкочелюстных *Aidanosagitta macilenta*.

Материал и методы. В качестве объекта исследования выбран вид *Aidanosagitta macilenta* Kassatkina (тип Chaetognatha, сем. Sagittidae). Материал собран в летние месяцы (июнь — август) в заливе Петра Великого (Японское море). На проведение данного исследования получено разрешение локального этического комитета (протокол № 4 от 20.12.2018 г.). Для электронно-микроскопического изучения животных фиксировали на холоду (4 °C) 2,5% глутаральдегидом на какодильном буфере при pH 7,4 в течение 40–60 мин с последующей дофиксацией 2% раствором четырехоксида осмия. Зафиксированный материал обезвоживали и заливали в аралдит. Для ориентировки в препарате использовали полутонкие срезы (1–2 мкм), окрашенные толуидиновым синим. Для электронно-микроскопического исследования тонкие срезы (50–80 нм) получали на ультратоме LKB III (Швеция) и снимали на сетки или бленды. В последнем случае применяли формваровые пленки-подложки. Срезы контрастировали насыщенным спиртовым раствором уранилацетата и цитратом свинца. Просмотр и фотографирование срезов проводили на электронных микроскопах JEM-7 (Япония), JEM-100B (Япония).

Результаты исследования. В области туловища *A. macilenta* кожный эпителий содержит 3–5 слоев клеток. В средней зоне эпителиального пласта клетки имеют многоугольную форму, так что выступы одной клетки заходят в углубления между соседними клетками. Клетки глубоких слоев — крупные, с более темной цитоплазмой, часто имеют аркообразную форму. По мере приближения к поверхности клетки становятся более вытянутыми и уплощенными, цитоплазма поверхностных клеток более электронно-плотная. Поверхностные клетки могут содержать обширную вакуоль в цитоплазме, а на поверхности —

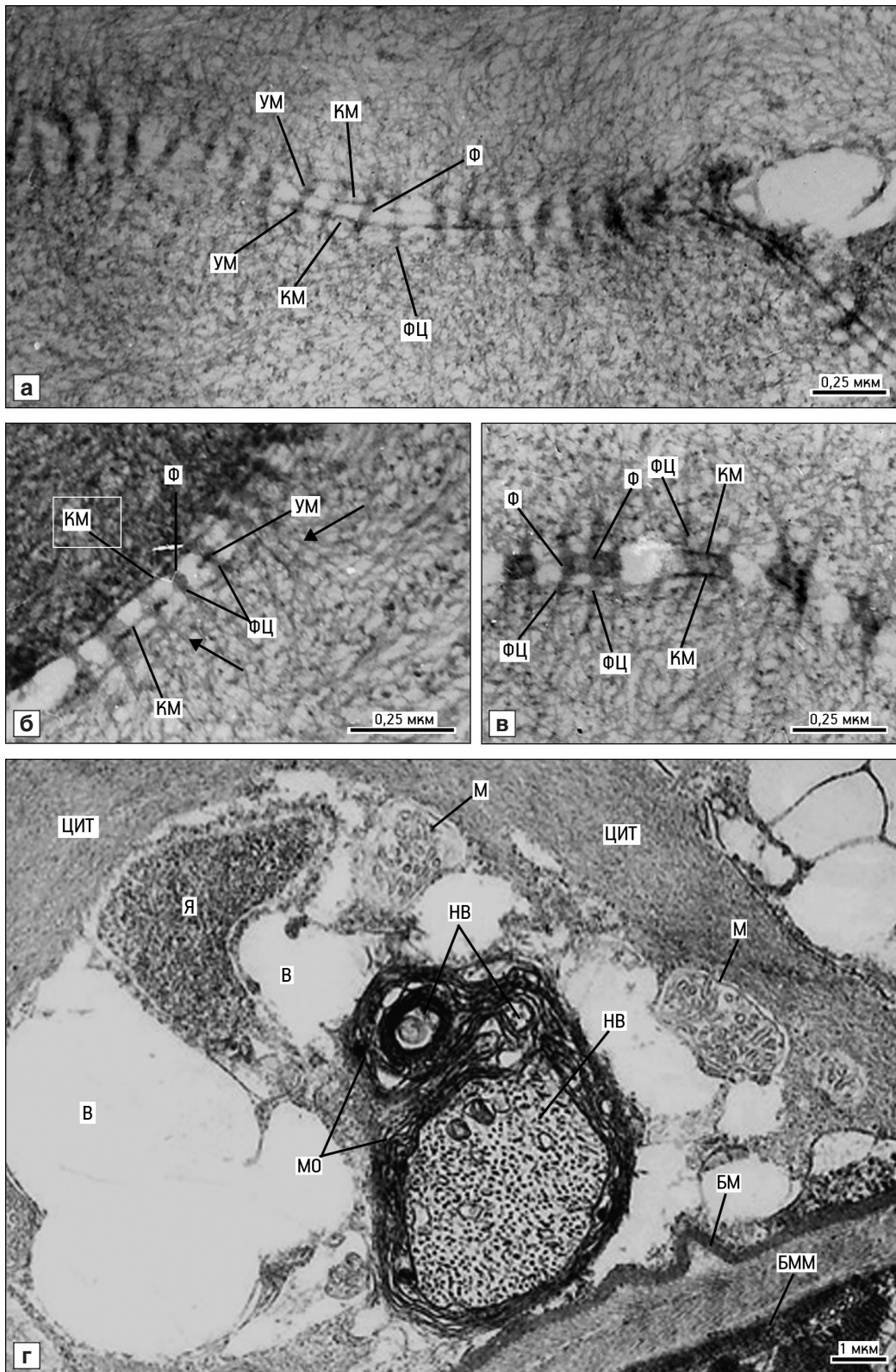
очень короткие немногочисленные микроворсинки.

Клетки эпителия обладают уникальной особенностью: большая часть объема их цитоплазмы заполнена фибриллярными структурами диаметром около 7 нм, образующими слои, параллельные поверхности. Внутри отдельного слоя микрофиламенты ориентированы преимущественно параллельно поверхности эпителия, однако направлены не прямолинейно, а изгибаясь вправо и влево, так что на срезе возникает структура в форме длинного колоса. Ширина слоев составляет 0,14–0,2 мкм. В соседних слоях направление расположения филаментов изменяется под углом около 90°. В совокупности микрофиламенты образуют единую сеть. Помимо филаментов, в составе сети имеются тесно ассоциированные с ними более или менее равномерно рассеянные мелкие плотные гранулы. Филаменты сети связаны с поверхностью цитоплазматической мембраны, ядра и органелл.

Ядро и немногочисленные органеллы находятся в центре клетки. Ядро имеет удлинённую, часто неправильную форму; в поверхностных клетках ядра вытянуты и уплощены. Ядра ориентированы в основном параллельно поверхности эпителия. Поперечный размер ядер составляет 2–4 мкм, продольные размеры — от 5 до 7–10 мкм. В клетках более глубоких слоев ядра светлые, в клетках вышележащих слоев — более темные. Встречаются небольшие ядрышки диаметром около 0,5–0,6 мкм. Наружная ядерная мембрана плохо просматривается, ядерные поры очень малочисленны.

Органеллы представлены одной или несколькими митохондриями, прилежащими к ядру; также вблизи ядра имеются скопление рибосом и комплекс Гольджи, отдельные элементы гранулярного эндоплазматического ретикулума. Митохондрии крупные, имеют на срезах округлую, овальную или удлинённую, а иногда кольцевидную форму. Их малый диаметр составляет 0,5–1,0 мкм, больший — около 2,0–4,0 мкм. Кристы трубчатого строения проходят в разных направлениях в электронно-светлом матриксе.

Клетки связаны особыми «мостичными» (фибрилярными) контактами, расположенными регулярно по всей их поверхности. Контакты образованы «толстыми» — диаметром 30–40 нм — фибриллами, соединяющими в виде мостиков плазмолеммы контактирующих клеток (рисунк, а). Продольные и поперечные разрезы фибрилл хорошо различимы на электронных микрофотографиях. Фибриллы располагаются на расстоянии 0,05–0,1 мкм друг от друга. От точек их соедине-



Кожный эпителий *Aidanosagitta macilenta* (Chaetognatha).

а — межклеточные «мостичные» контакты, представленные фибриллами (Ф), соединяющими в виде мостиков плазмолеммы (КМ) соседних клеток. УМ — уплотнения мембран в точках контакта с фибриллами; ФЦ — фибриллы цитоплазмы, связывающие уплотнения мембран с сетью цитоплазматических филаментов; б — межклеточные «мостичные» контакты. ФЦ, отходящие от УМ, разветвляются и вплетаются в фибриллярный матрикс цитоплазмы (стрелки); в — межклеточные «мостичные» контакты, близкое расположение связующих Ф; г — базальная зона эпителия. Нервные волокна (НВ) в глубине эпителия, окруженные миелиноподобной мембранной оболочкой (МО). БМ — базальная мембрана эпителия; БММ — базальная мембрана мышечных клеток; В — вакуоли в цитоплазме эпителиальной клетки; М — митохондрии; ЦИТ — цитоплазма эпителиальной клетки; Я — ядро эпителиальной клетки. Ув.: а — 52 300; б — 65 000; в — 60 000; г — 9200

ния с клеточными мембранами в цитоплазму отходят фибриллы такого же диаметра, направления и электронной плотности, так что возникает картина фибрилл, пересекающих мембраны соседних клеток и как бы «прошивающих» цитоплазму. Фибриллы таким образом кажутся непрерывными и прослеживаются на расстояние до 0,3–0,5 мкм. На концах они истончаются и разветвляются, вплетаясь в микрофибрилярную сеть цитоплазмы (см. рисунок, б). В точках контакта с «толстыми» фибриллами мембраны выглядят утолщенными, похожие уплотнения встречаются на границе с фибриллярной сетью. Эти уплотнения представляют собой, по-видимому, гранулы, рассеянные в микрофибрилярной сети. По ходу одной «толстой» фибриллы можно видеть 4 уплотнения: 2 — на уровне мембран и 2 — на границе с микрофибрилярной сетью. Мембраны между соседними контактами часто имеют более низкую электронную плотность, создавая впечатление перерывов. При этом фибриллярные «мостики» сохраняют свою целостность, в результате чего возникают единые фибриллярные тяжи, связывающие и объединяющие микрофибрилярные сети соседних клеток. Иногда фибриллы располагаются сближенно, группами — по 2–3. В этих случаях в пространстве, ограниченном фибриллами и контактирующими мембранами, обнаруживается электронно-плотное вещество (см. рисунок, в).

В отдельных участках эпителия находятся клетки иного строения: это мерцательные клетки с ресничками, снабженными «корневыми нитями» (базальными тельцами). Клетки образуют 2–3 слоя на поверхности эпителия. Базальные части этих клеток связаны с клетками нижележащих слоев «мостичными» контактами, апикальные части клеток — промежуточными и септированными соединениями.

В базальной зоне эпителия располагаются элементы интраэпителиальной нервной системы — нервные волокна диаметром до 2,3 мкм, которые ориентированы продольно, вдоль оси тела. В нервных волокнах различимы нейротрубочки, нейрофиламенты и пузырьки различного диаметра со светлым содержимым (см. рисунок, г). Базальные клетки эпителия охватывают пучки нервных волокон, принимая аркообразную форму. Наиболее крупные нервные отростки имеют многослойную мембранную миелопоподобную оболочку (см. рисунок, г), что свидетельствует о существовании соответствующих глиальных клеток, ее образующих.

Обсуждение полученных результатов. В клетках кожного эпителия *A. macilenta*

доминирующими структурами являются фибриллы, которые поддерживают целостность клетки и придают ей существенную прочность. Сходное строение имеют клетки и у других исследованных видов щетинкочелюстных [7, 15].

Наличие структур, пересекающих межмембранное пространство, придает «мостичным» контактам сходство с септированными соединениями. Однако они отличаются от септированных контактов значительным расстоянием между мембранами, намного большими диаметром и длиной связующих элементов, расположением по всей поверхности контактирующих клеток. Отсутствие аналогов для «мостичных» контактов среди известных типов межклеточных соединений: промежуточные (*zonula adhaerens*), десмосомы (*macula adhaerens*), плотные (*zonula occludens*), щелевые (*nexus*), септированные — позволяет выделить их в особый тип. Такие контакты («*columnar junctions*») описаны также в каждом эпителии у других представителей щетинкочелюстных: *Sagitta setosa* [7], *Parasagitta elegans* [15]. «Мостичные» контакты отсутствуют у представителей других групп животных, что можно полагать отличительной чертой тканевой организации щетинкочелюстных. Наличие многослойного кожного эпителия, особых «мостичных» контактов и митохондрий с трубчатыми кристами свидетельствует об обособленном положении группы *Chaetognatha*.

Многослойный кожный эпителий щетинкочелюстных и эпидермис позвоночных не тождественны по своему строению, они представляют случай тканевых параллелизмов. Кожный эпителий щетинкочелюстных представляет собой примитивную двухкомпонентную тканевую систему, в которой эпителиальные клетки тесно и неразрывно ассоциированы с элементами нервной ткани. В то же время, присутствуют осложнения строения в виде примитивной миелинизации нервных волокон. Наличие миелинизированных аксонов коррелирует со способностью щетинкочелюстных к быстрым скачкообразным движениям.

Поскольку щетинкочелюстных рассматривают как очень древнюю группу [9], близкую к предкам билатеральных животных, можно предполагать, что гипотетические предки *Bilateria* обладали покровами, в которых еще были совмещены эпителиальные и нейральные элементы.

Заключение. Существует мнение, что на ранних этапах эволюции животных нервная система не была обособлена, а располагалась интраэпителиально в виде нервного плексуса. Среди современных животных интраэпителиаль-

ная нервная система встречается у первичноротых и низших вторичноротых, в частности, кишечнодышащих [1].

Авторы выражают благодарность коллективу группы ультраструктуры клеточных мембран Института цитологии РАН, проф. Яну Юдовичу Комиссарчику и д-ру биол. наук Екатерине Сергеевне Снигиревской за помощь, содействие в выполнении работы на базе лаборатории и ценные консультации.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: М. В. С.

Сбор и обработка материала: А. П. К., М. В. С.

Написание текста: М. В. С., А. П. К.

Редактирование: М. В. С., А. П. К.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Атаманова М.В. Ультраструктурные особенности кожного эпителия *Saccoglossus mereschkowskii* (Enteropneusta) // Цитология. 1978. Т. XX, № 12. С. 1355–1359 [Atamanova M. V. Ultrastructural features of the skin epithelium of *Saccoglossus mereschkowskii* (Enteropneusta) // Tsitologiya. 1978. Vol. XX, № 12. P. 1355–1359. In Russ.].
- Заварзин А.А. Сравнительная гистология. СПб.: Изд-во Санкт-Петербургск. ун-та, 2000. 518 с. [Zavarzin A. A. Comparative histology. SPb.: Izdatel'stvo Sankt-Peterburgskogo universiteta, 2000. 518 p. In Russ.].
- Кусакин О.Г., Дроздов А.Л. Филема органического мира. Т. 1. Прологомены к построению филемы. СПб.: Наука, 1994. 282 с. [Kusakin O. G., Drozdov A. L. Filema of the organic world. Vol. 1. Prolegomena to the construction of filema. SPb.: Nayka, 1994. 282 p. In Russ.].
- Bromham L.D., Degnan B.M. Hemichordates and deuterostome evolution: robust molecular phylogenetic support for a hemichordate+echinoderm clade // *Evol. Dev.* 1999. Vol. 1, № 3. P. 166–171.
- Buryi G.I., Kasatkina A.P., Zhuravlev A.V., Safronov P.P. First finding of euconodont animals (Euconodontophylea) imprints on the territory of Russia // *Zoosystematica Rossica*. 2010. Vol. 19, № 1. P. 147–153.
- Cameron C.B., Garey J.R., Swalla B.J. Evolution of the chordate body plan: new insights from phylogenetic analyses of deuterostome phyla // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. Vol. 97, № 9. P. 4469–4474.
- Duvert M., Bouligand Y., Salat C. The liquid crystalline nature of the cytoskeleton in epidermal cells of the chaetognath *Sagitta setosa* // *Tissue Cell*. 1984. Vol. 16. P. 469–481.
- Holland R.W., Garcia-Fernández J. Hox genes, developmental evolution and the origin of vertebrates // *Ontogenez*. 1996. Vol. 27, № 4. P. 273–279.
- Marlétaz F., Gilles A., Caubit X., Perez Y., Dossat C., Samain S., Gyapay G., Wincker P., Le Parco Y. Chaetognath transcriptome reveals ancestral and unique features among bilaterians // *Genom Biology*. 2008. 9: R94. doi: 10.1186/gb-2008-9-6-r9
- Matus D.Q., Halanych K.M., Martindale M.Q. The Hox gene complement of a pelagic chaetognath, *Flaccisagitta inflata* // *Integr. Comp. Biol.* 2007. Vol. 47, № 6. P. 854–864.
- Ruddle F.H., Bentley K.L., Murtha M.T., Risch N. Gene loss and gain in the evolution of the vertebrates // *Dev. Suppl.* 1994. P. 155–161.
- Ruiz-Trillo I., Roger A.J., Burger G., Gray M.W., Lang B.F. A phylogenetic investigation into the origin of Metazoa // *Mol. Biol. Evol.* 2008. Vol. 25, № 4. P. 664–672.
- Telford M.J., Holland P.W.H. The Phylogenetic Affinities of the Chaetognaths: A Molecular Analysis // *Mol. Biol. Evol.* 1993. Vol. 10, № 3. P. 660–676.
- Turbeville J.M., Schultz J.R., Raff R.A. Deuterostome phylogeny and the sister group of the chordates: evidence from molecules and morphology // *Mol. Biol. Evol.* 1994. Vol. 11, № 4. P. 648–655.
- Shinn G.L. *Chaetognatha* // *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. New-York: Wiley-Liss, 1997. Vol. 15. P. 103–220.

Поступила в редакцию 14.07.2019

ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF THE STRATIFIED SKIN EPITHELIUM OF AIDANOSAGITTA MACILENTA (CHAETOGNATHA) AND THEIR EVOLUTIONARY SIGNIFICANCE

M. V. Stolyarova¹, A. P. Kassatkina²

Objective — a detailed study of the ultrastructural characteristics of the stratified skin epithelium of *Aidanosagitta macilenta* — representative of phylum Chaetognatha which is considered as an ancient, early diverging branch of Bilateria.

Material and methods. *Aidanosagitta macilenta* Kassatkina (Chaetognatha, fam. Sagittidae) was investigated by transmission electron microscopy. The material was collected in summer (June–August) in the Peter the Great Gulf (Sea of Japan). The animals were fixed for 40–60 min at 4 °C in cacodylate buffered 2.5% glutaraldehyde (pH 7.4) and post-fixed in 2% OsO₄. The fixed material was dehydrated and embedded in Araldite. The ultrathin sections were examined with JEM-7 and JEM-100B electron microscopes.

Results. The data obtained show unique epithelium structural characteristics: fibrillar structure of cell cytoplasm, special bridge-like intercellular junctions which have no analogues among the known types of intercellular junctions, primitive myelination of nerve fibers located inside the epithelium. Skin epithelium of Chaetognatha is a primitive two-component tissue system where epithelial cells are closely associated with the elements of nervous tissue.

Conclusions. The presence of stratified skin epithelium, special bridge-like intercellular junctions and mitochondria with tubular cristae is the evidence of Chaetognatha separate position in the phylogenetic system. Stratified skin epithelium of Chaetognatha and epidermis of vertebrates are not identical in structure, they represent a case of tissue parallelism. It can be assumed that the hypothetical ancestors of Bilateria had integuments in which epithelial and neural elements were combined.

Key words: *epithelia, Chaetognatha, intercellular junctions, evolution*

¹ Department of Histology and Embryology n.a. prof. A. G. Knorre, St. Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya St., St. Petersburg 194100; ² Laboratory of Ecology, V. I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Russian Academy of Science, Far Eastern Branch, 43 Baltiyskaya St., Vladivostok 690041