

© М. В. Столярова, Э. И. Валькович, 2013
УДК 591.87:593.99

М. В. Столярова и Э. И. Валькович

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ КОЖНОГО ЭПИТЕЛИЯ У *SACCOGLOSSUS MERESCHKOWSKII* — ENTEROPNEUSTA, HEMICHORDATA: ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ И ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Кафедра гистологии и эмбриологии (зав. — проф. Э. И. Валькович), Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

Цель исследования — выявление регуляторных элементов в кожном эпителии кишечнодышащих — животных, близких к предкам хордовых. Методом электронной микроскопии установлено, что в кожном эпителии представителя кишечнодышащих — *Saccoglossus mereschkowskii* базальные части некоторых эпителиоцитов участвуют в образовании нервного слоя. Данные клетки рассматриваются как реснитчатые рецепторные. Показано выделение секрета зернистыми клетками эпителия как по экзокринному, так и по эндокринному типу, что характеризует их как эндокриноподобные регуляторные клетки. Мелкозернистые клетки представляют собой, возможно, особые рецепторно-эндокриноподобные клетки. Иммуноцитохимическое выявление на гистологических срезах локализации нейропептида FMRFамида подтверждает данные электронной микроскопии о наличии в эпителии рецепторных и эндокриноподобных клеток. Констатируется существование в кожном эпителии кишечнодышащих своеобразной нейроэндокринной регуляторной системы, представленной рецепторными и рецепторно-эндокриноподобными клетками открытого типа и нервными элементами нервного слоя.

Ключевые слова: кожный эпителий, ультраструктура, иммуноцитохимия, кишечнодышащие, эволюция

Кишечнодышащие (Enteropneusta) относятся к полухордовым животным (Hemichordata). В филогенетической системе они находятся у основания ветви хордовых, ствола вторичноротых, и представляют собой уникальный объект для сравнительно-морфологических исследований. Молекулярно-биологические данные свидетельствуют, что кишечнодышащие среди современных животных наиболее близки к древним вторичноротым [8, 10]. В связи с этим изучение эпителиальных тканевых систем, их клеточного состава и клеточных взаимодействий у кишечнодышащих важно для понимания эволюционного становления эпителиальных тканей и формирования тканевых регуляторных механизмов.

В основании кожного эпителия кишечнодышащих расположен нервный слой, представленный нервными клетками и нервными волокнами. Строение кожного эпителия у разных видов кишечнодышащих описано на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях [1, 2, 6, 7]. Кожный эпителий *Saccoglossus mereschkowskii* — однослойный ложномногорядный реснитчатый, толщина которого достигает 200–300 мкм и более [1]. В кожном эпителии кишечнодышащих выделяют реснитчатые клетки и несколько видов

железистых клеток. Реснитчатые клетки содержат в апикальной части миофиламенты и представляют собой эпителиально-мышечные клетки [6]. На светооптическом уровне выявлены чувствительные клетки с помощью окраски метиленовым синим [9] и импрегнации нитратом серебра [14].

Типичные эндокринные клетки в эпителиях у кишечнодышащих не обнаружены. Однако с помощью иммуноцитохимических методов у *Saccoglossus* и *Ptychodera bahamensis* выявлено присутствие гонадотропин-рилизинг гормона, который обнаруживается в гранулах зернистых клеток кожного эпителия [11]. Поскольку гранулы этих клеток выделяются наружу, авторами предполагается экзокринная функция гормона.

Цель настоящего исследования — выявление регуляторных элементов кожного эпителия у представителя кишечнодышащих *Saccoglossus mereschkowskii*.

Материал и методы. В качестве объекта исследования выбран широко распространенный вид — *Saccoglossus mereschkowskii* (Enteropneusta, Hemichordata). Работу по сбору и фиксации животных проводили на базе Мурманского морского биологического института. Материал для исследо-

Сведения об авторах:

Столярова Марина Владимировна (e-mail: mvstolyarova@yandex.ru), Валькович Эрнест Иванович, кафедра гистологии и эмбриологии, Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2

вания собирали в летний период (июль) на литорали побережья Баренцева моря в районе Дальних Зеленцов.

Для электронно-микроскопического изучения животных рассекали в поперечном направлении на небольшие фрагменты и фиксировали на холоду (при 4 °C) 2,5% глутаральдегидом на фосфатном или какодилатном буфере при pH 7,4 в течение 40–60 мин, после чего дофиксировали 1–2% раствором четырехокси осмия. Тоничность фиксирующих жидкостей доводили до уровня тоничности морской воды (для Баренцева моря — 1000 мосмолей) добавлением сахарозы или хлористого натрия. Фиксированный материал после обезвоживания по стандартной методике заключали в аралдит. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим. Ультратонкие срезы получали на ультратоме (LKB, Швеция) и контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали в электронных микроскопах JEM-5G и JEM-7 (Jeol, Япония).

Иммуноцитохимическим методом определяли локализацию нейропептида FMRFамида с целью выявления рецепторных (нейросенсорных) и регуляторных элементов. FMRFамид-подобные пептиды рассматриваются как нейротрансмиттеры/нейромодуляторы, а их наличие в эндокринных клетках кишечника насекомых дает основание предполагать, что они являются гормонами [12]. Для иммуноцитохимического исследования использовали животных, фиксированных в жидкости Буэна в течение 24 ч. Иммуноцитохимическую реакцию проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 5–6 мкм. Срезы депарафинировали, промывали 20 мин в воде и помещали на 30 мин в 1% перекись водорода для инактивации эндогенной пероксидазы. После промывки в воде препараты выдерживали 30 мин в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (PBS) при pH 7,4, содержащем 0,3% Тритон X-100 (PBS-TX). Для устранения неспецифического окрашивания препараты выдерживали в PBS-TX, содержащем 2,5% бычий альбумин (PBS-TX — BSA), в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем срезы инкубировали с поликлональными кроличьими антителами к FMRFамиду (ImmunoStar, США) в разведении 1:1000–1:2000 на PBS-TX — BSA в течение 3 ч при комнатной температуре. После промывки в PBS-TX срезы обрабатывали вторыми биотинилированными антителами против иммуноглобулинов кролика в течение 20 мин и стрептавидин-пероксидазой (DAKO, Дания) в течение 10 мин. Для визуализации продукта реакции использовали 3,3'-диаминобензидин. Контролем служили срезы, обработанные только вторыми антителами. Препараты исследовали под световым микроскопом Leica DME (Leica, Германия), изображения структур были получены с помощью цифровой видеокамеры Leica ES3 (Leica, Германия). На гистологических препаратах с помощью окулярного микрометра, а на электронных микрофотографиях — с помощью измерительной системы определяли количественные параметры тканевых и клеточных структур.

Результаты исследования. Электронно-микроскопическое исследование показало, что в образовании интраэпителиального нервного слоя кожного эпителия у *S. mereschkowskii* принимают участие базальные отростки некоторых эпителиальных клеток. Можно наблюдать, как на границе с нервным слоем базальные отростки эпителиальных клеток поворачивают вдоль нервного слоя и входят в него (рис. 1, а). Отсутствие гранул в цитоплазме отростков позволяет предположить,

что эпителиальные клетки с базальными отростками в нервном слое относятся к реснитчатым клеткам.

Зернистые клетки, представленные крупно- и мелкозернистыми клетками, прослеживаются от поверхности эпителия до базальной мембраны. Их цитоплазму заполняют округлые ограниченные мембраной секреторные включения, диаметр которых в крупнозернистых клетках колеблется от 0,3 до 1,2 мкм, в мелкозернистых — содержатся включения диаметром 0,09–0,2 мкм. Электронная плотность гранул крупно- и мелкозернистых клеток варьирует. Содержимое более светлых гранул имеет вид мелких зерен и нитей, материал электронно-плотных гранул при малых увеличениях электронного микроскопа выглядит аморфным, но при большем разрешении выявляется его тонкофибриллярная структура. В крупнозернистых клетках разные виды секреторных гранул встречаются примерно в одинаковом количестве, в мелкозернистых клетках преобладают электронно-плотные гранулы. Секреторные гранулы присутствуют в апикальных, центральных и базальных частях зернистых клеток. Базальные части мелкозернистых клеток обнаружены в составе слоя нервных волокон (см. рис. 1, б). Установлено выделение секрета из гранулы крупнозернистой клетки на границе с базальной мембраной (рис. 2, а). Полученные данные позволяют предположить, что зернистые клетки выделяют секрет как по экзокринному, так и по эндокринному типу и представляют собой регуляторные эндокриноподобные клетки.

Нервный слой образован идущими параллельно поверхности волокнами диаметром от 0,2 до 1,0 мкм, направление которых в основном совпадает с длинной осью тела животного. Многие волокна имеют гранулы диаметром от 0,06 до 0,15 мкм со светлым или темным содержимым, рассеянные диффузно или образующие небольшие скопления. Диаметр и содержимое гранул варьируют. Можно различить следующие типы гранул: первый — сферические гранулы диаметром 150–200 нм умеренной электронной плотности (см. рис. 2, г); второй — умеренно электронно-плотные гранулы диаметром 50–100 нм (см. рис. 2, г); третий — гранулы сферической или овальной формы диаметром 60–150 нм с узким светлым галом и электронно-плотной сердцевинкой (см. рис. 2, д); четвертый — сферические гранулы диаметром 40–70 нм со светлым гомогенным содержимым (см. рис. 2, е); пятый — сферические гранулы диаметром 80–100 нм со светлым гетерогенным содержимым (см. рис. 2, е). В одном волокне могут



Стрелки — базальные отростки эпителиальных клеток, входящие в слой нервных волокон; ВНС — волокна нервного слоя; ГР — гранулы; МЗК — мелкозернистая клетка; НВ — слой нервных волокон; Я — ядро; Яд — ядрышко

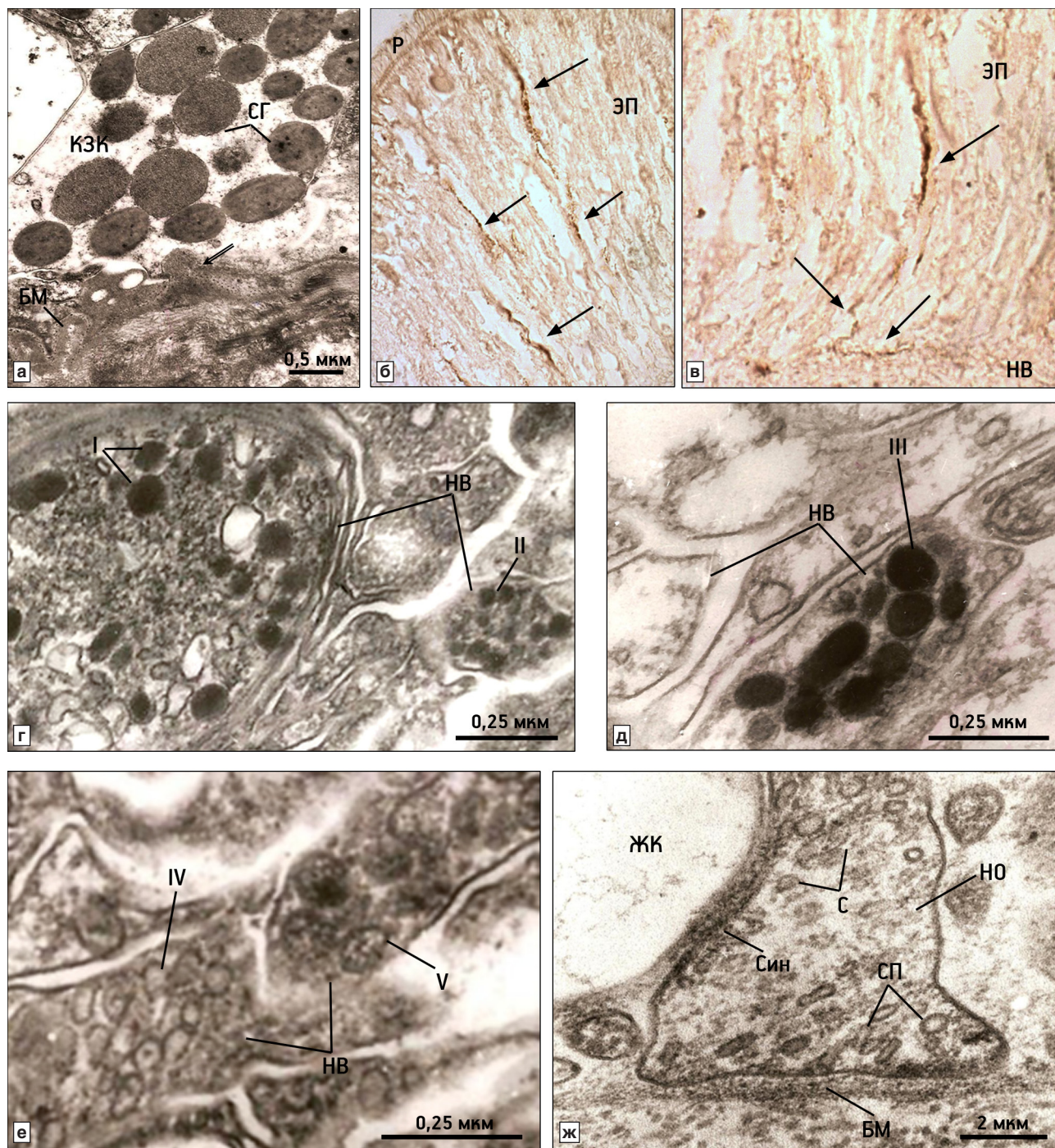


Рис. 2. Кожный эпителий *Saccoglossus mereschkowskii*.

а — базальная часть крупнозернистой клетки; б, в — FMRFамид-иммунореактивные клетки: б — в поверхностной и центральной областях эпителия, в — в базальной части эпителия; г-е — гранулы в составе нервных волокон; ж — синаптическое нервное окончание на границе с базальной мембраной. Сдвоенная стрелка — выделение секрета из гранулы крупнозернистой клетки на границе с базальной мембраной; стрелки — FMRFамид-иммунореактивный материал в клетках эпителия и их отростках; БМ — базальная мембрана; ЖК — железистая клетка; КЗК — крупнозернистая клетка; НВ — нервные волокна; НО — нервное окончание; СГ — секреторные гранулы; Син — синаптический контакт; СП — синаптические пузырьки; ЭП — эпителий; I-V — типы гранул нервных волокон. б, в — иммуноцитохимическая реакция на нейропептид FMRFамид. б, в — об. 100, ок. 10

находиться одновременно и электронно-плотные, и светлые гранулы.

Гранулы первого-третьего типов сходны с гранулами эндокринных, эндокриноподобных и пептидергических нейросекреторных клеток,

характерных для позвоночных и беспозвоночных животных.

В глубине эпителия на границе с нервным слоем выявлены нейроноподобные клетки с крупными светлыми ядрами округлой формы, образующие с соседними клетками синапсоподобные контакты

по типу щелевого соединения. Обнаружены контакты терминалей нервных волокон, содержащих пузырьки, подобные синаптическим, и железистых (зернистых) клеток (см. рис. 2, ж), что указывает на нейрональную регуляцию функции зернистых клеток. Отдельные нервные окончания, содержащие синаптические пузырьки, контактируют с базальной мембраной (см. рис. 2, ж). Данный факт свидетельствует о том, что регуляция функции мышц может осуществляться путем диффузии медиатора через базальную мембрану в гемальные пространства. Это предположение объясняет отсутствие непосредственных контактов между нервными и мышечными элементами.

Методом иммунопероксидазной цитохимии на светооптическом уровне в цитоплазме узких клеток открытого типа (достигающих поверхности) и в отростках клеток, уходящих в нервный слой, показана локализация FMRFамид-иммунореактивного материала (см. рис. 2, б, в). По строению и расположению FMRFамид-иммунореактивные элементы соответствуют зернистым клеткам, что подтверждает высказанное предположение о роли зернистых клеток как регуляторных эндокриноподобных клеток. Также FMRFамид-иммунореактивность проявляют нервные клетки, расположенные на уровне нервного слоя в основании эпителия.

Обсуждение полученных данных. В настоящей работе показано, что интраэпителиальный нервный слой кожного покрова *S.mereschkowskii* образован как нервными волокнами, так и входящими в него базальными отростками некоторых эпителиальных клеток. По строению эти клетки соответствуют реснитчатым клеткам. Реснитчатые клетки, направляющие базальные отростки в нервный слой, по-видимому, являются рецепторными элементами. Это заключение согласуется с тем, что специальные органы чувств у кишечнодышащих отсутствуют. В кожном и кишечном эпителиях представителей многих групп беспозвоночных нейроноподобные, эндокриноподобные и рецепторные клетки могут иметь на поверхности реснички или микроворсинки [4, 5]. Показано, что мембрана всех ресничек содержит специфические рецепторы и ионные каналы, которые запускают сигнальные механизмы, контролирующие подвижность ресничек и/или реагирующие на механические или химические стимулы [13]. В частности, плазматическая мембрана жгутиков обонятельных клеток содержит хемосенсорные рецепторные молекулы [3].

Анализ данных литературы позволяет сделать заключение, что чувствительные реснитчатые клетки могут осуществлять хеморецепцию и, воз-

можно, обеспечивают тактильную чувствительность [3, 13].

Зернистые клетки кожного эпителия *S.mereschkowskii* обладают как экзокринной, так и эндокринной секрецией, что дает основание рассматривать их как регуляторные эндокриноподобные клетки. Выявленная локализация FMRFамид-иммунореактивного материала в зернистых эпителиальных клетках открытого типа и клеточных отростках, идущих в нервный слой, подтверждает данные электронной микроскопии о роли их как эндокриноподобных клеток. Мелкозернистые клетки, которым некоторые авторы придают значение рецепторных [15], представляя собой, по-видимому, особые рецепторно-эндокриноподобные клетки. Обнаруженные контакты нервных волокон и зернистых клеток свидетельствуют о нейрональной регуляции функции зернистых клеток.

Полученные данные позволяют сделать вывод о существовании в кожном эпителии кишечнодышащих своеобразной нейроэндокринной регуляторной системы, представленной рецепторными и рецепторно-эндокриноподобными клетками открытого типа и нервными элементами нервного слоя. Можно предполагать, что биологически активные вещества, выделяемые через базальные части эндокриноподобных зернистых клеток и синапсоподобные окончания нервных клеток, не только регулируют деятельность самих эпителиальных клеток, включая мерцательную, сократительную и секреторную активность, но и выделяются через базальную мембрану в гемальные пространства, осуществляя гуморальную регуляцию.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-1033).

ЛИТЕРАТУРА

1. Атаманова М.В. Кожный и кишечный эпителии кишечнодышащих как этап филогенетического развития эпителиев хордовых. Арх. анат., 1977, т. 73, вып. 9, с. 55–61.
2. Атаманова М.В. Ультраструктурные особенности кожного эпителия *Saccoglossus mereschkowskii* (Enteropneusta). Цитология, 1978, т. 20, № 12, с. 1355–1359.
3. Бигдай Е.В., Самойлов В.О., Руденко Я.Н. и др. Две молекулярные системы подвижности обонятельных жгутиков лягушки. Биофизика, 2008, т. 53, вып. 6, с. 997–1000.
4. Зайцева О.В. Нервные клетки в эпителии пищеварительного тракта брюхоногих моллюсков. Докл. РАН, 2006, т. 408, № 2, с. 280–282.
5. Пунин М.Ю. Кишечная регуляторная система беспозвоночных животных и ее предполагаемая эволюция у многоклеточных. Труды Зоол. ин-та РАН (СПб.), 2001, т. 290.
6. Столярова М.В. Сравнительная морфолого-физиологическая характеристика и реактивные особенности эпителиальных систем у животных разных уровней организации и

- человека: филогенетический аспект: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2012.
7. Benito J. and Pardos F. Hemichordata. In.: Microscopic Anatomy of Invertebrates. New-York, Wiley-Liss, 1997, v. 15, p. 15–101.
 8. Bromham L.D. and Degnan B.M. Hemichordates and deuterostome evolution: robust molecular phylogenetic support for a hemichordate+echinoderm clade. *Evol. Dev.*, 1999, v. 1, № 3, p. 166–171.
 9. Bullock T.H. The anatomical organization of the nervous system of Enteropneusta. *Quart. J. Micr. Sci.*, 1945, v. 86, p. 55–111.
 10. Cameron C.B., Garey J.R. and Swalla B.J. Evolution of the chordate body plan: new insights from phylogenetic analyses of deuterostome phyla. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, v. 97, № 9, p. 4469–4474.
 11. Cameron C.B., Mackie G.O., Powell J.F. et al. Gonadotropin-releasing hormone in mulberry cells of *Saccoglossus* and *Ptychodera* (Hemichordata, Enteropneusta). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1999, v. 114, № 1, p. 2–10.
 12. Haselton A.T., Yin C. and Stoffolano J.G. FMRFamide-like immunoreactivity in the central nervous system and alimentary tract of the non-hematophagous blow fly, *Phormia regina*, and the hematophagous horse fly, *Tabanus nigrovittatus*. *J. Insect. Sci.*, 2008, v. 8, Art. 65, p. 1–17.
 13. Satir P. and Christensen S.T. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu. Rev. Physiol.*, 2007, v. 69, p. 377–400.
 14. Silén L. On the nervous system of *Glossobalanus marginatus* Meek (Enteropneusta). *Acta Zool. (Stockh.)*, 1950, v. 31, p. 149–175.
 15. Welsch U. Hemichordata. In: *Biology of the Integument*. v. 1. Invertebrates. Berlin, Springer, 1984, p. 790–799.

Поступила в редакцию 28.06.2013

REGULATORY ELEMENTS IN THE SKIN EPITHELIUM OF *SACCOGLOSSUS MERESCHKOWSKII* (ENTEROPNEUSTA, HEMICHORDATA): ELECTRON MICROSCOPIC AND IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY

M. V. Stolyarova and E. I. Valkovich

The aim of this investigation was to demonstrate the regulatory elements in the skin epithelium of Enteropneusta which are supposed to be related to the chordate ancestors. Using electron microscopy, it was found that in the skin epithelium of a representative of enteropneusts *Saccoglossus mereschkowskii*, the basal parts of some epitheliocytes took part in formation of a nerve layer. These cells were considered as receptor ciliated cells. The granular epithelial cells were shown to release secretion according to both exocrine and endocrine mechanism; these cells were characterized as endocrine-like regulatory cells. Fine granular cells possibly represent special receptor-endocrine-like cell type. The immunocytochemical detection of FMRFamid neuropeptide localization in histological sections confirmed the electron microscopic data on the presence of receptor and endocrine-like cells in the epithelium. It is suggested that the skin epithelium of Enteropneusta contains a peculiar neuro-endocrine regulatory system that is represented by receptor cells, receptor-endocrine-like cells of an open type and nerve elements of the nerve layer.

Key words: *skin epithelium, ultrastructure, immunocytochemistry, Enteropneusta, evolution*

Department of Histology and Embryology, St. Petersburg State Pediatric Medical University